

Universidad ORT Uruguay
Facultad de Ingeniería

Generación de nanoanticuerpos inhibidores de citoquinas proinflamatorias relacionadas con enfermedades de la piel

Entregado como requisito para la obtención del título de Ingeniero en Biotecnología

Mathias Costa - 223805 y Lucía Patrón - 200568

Tutor: Lucía Vanrell

2022


Declaración de autoría

Nosotros, Lucía Patrón y Mathias Costa, declaramos que el trabajo que se presenta en esta obra es de nuestra propia mano. Podemos asegurar que:

1. La obra fue producida en su totalidad mientras realizábamos el proyecto final de carrera de Ingeniería en Biotecnología;
2. Cuando hemos consultado el trabajo publicado por otros, lo hemos atribuido con claridad;
3. Cuando hemos citado obras de otros, hemos indicado las fuentes. Con excepción de estas citas, la obra es enteramente nuestra;
4. En la obra, hemos acusado recibo de las ayudas recibidas;
5. Cuando la obra se basa en trabajo realizado conjuntamente con otros, hemos explicado claramente qué fue contribuido por otros, y qué fue contribuido por nosotros;
6. Ninguna parte de este trabajo ha sido publicada previamente a su entrega, excepto donde se han realizado las aclaraciones correspondientes.



Lucía Patrón



Mathias Costa

10 de agosto 2022

“A mi madrina Titi y Pikis”

-Mathias Costa

“A Mona, Bulé, Mimi, Abuelo Polo y Papá”

-Lucía Patrón

Agradecimientos

Nos gustaría agradecer a las instituciones que ayudaron a que este proyecto se pudiera realizar: el Laboratorio de Biotecnología de la Universidad ORT Uruguay y CBI+I. Especialmente a Toto que estuvo siempre dispuesto a ayudarnos en cualquier duda que nos surgía.

Queremos agradecer a todo el equipo del Laboratorio de ORT, por ayudarnos a desempeñarnos con soltura, tomando su tiempo para explicarnos cuando las cosas no quedaban claras. A Seba que siempre estaba dispuesto a darnos una mano o pedirnos PBS, y a Feli y Umpi que nos acompañaban incluso cuando las jornadas se hacían interminables.

En especial a la Dra. Erienne Jackson, por sus tantas explicaciones, ayuda y paciencia para utilizar el FPLC. Recalamos su apoyo a nuestra carrera y sus consejos personales a lo largo de la tesis.

También a la Ing. Laura Salaberry, con quien compartimos la mayor cantidad de instancias de laboratorio y pasó a convertirse en nuestra “cotutora informal”. Por su paciencia, ayuda y explicativa para llevar adelante las dificultades que pudieran surgir.

Agradecemos a todos nuestros compañeros de laboratorio y generación que siempre supieron alentarnos y preguntarnos “*¿hoy se quedan hasta tarde?*” y conociendo la respuesta se limitaban a decir “*que les sea leve*”.

Finalmente queremos agradecer a nuestras familias y amigos, por ser el pilar fundamental de apoyo a nuestra formación como personas y como profesionales.

Resumen

Las enfermedades inflamatorias de la piel (como la psoriasis y la dermatitis atópica) afectan a más de 600 millones de personas a nivel mundial. Aunque habitualmente son consideradas poco graves, constituyen la cuarta causa de discapacidad de la población con importantes efectos psicológicos y sociales. El 30% de los pacientes sufren desórdenes, como depresión, ansiedad, intentos suicidas, entre otros.

Para tratar estas patologías, además de los tratamientos con fármacos convencionales (como corticoides y algunos inmunosupresores), en los últimos años han surgido tratamientos biológicos con anticuerpos monoclonales para casos graves de enfermedad. Estos biofármacos muestran muy buena eficacia al ser administrados sistémicamente. Sin embargo, tienen alto costo y no son apropiados para formulaciones en cremas por ser moléculas inestables y demasiado grandes para penetrar en las capas de la piel. Además, debido a su administración sistémica aumentan la aparición de efectos adversos en órganos internos, imposibilitando su uso en personas con enfermedades previas.

Los nanoanticuerpos son proteínas monodominio, recombinantes y derivadas del dominio de unión a antígeno de los anticuerpos de cadena pesada ($V_{\text{H}}\text{Hs}$) presentes en camélidos. Son una herramienta alternativa a los monoclonales convencionales para el tratamiento de enfermedades de la piel, ya que al ser los fragmentos de anticuerpos más pequeños (15 kDa) y estables que existen, es posible formularlos en aplicaciones tópicas y ser administrados de forma localizada, lo que evitaría la aparición de efectos secundarios adversos.

Por otra parte, se producen de forma simple, generando altos rendimientos a muy bajos costos en sistemas de expresión procariotas. Gracias a su gran estabilidad fisicoquímica, no necesitan cadena de frío para ser almacenados y distribuidos, lo que disminuye notoriamente sus costos de logística y almacenamiento.

El objetivo de este trabajo fue la generación de nanoanticuerpos (utilizando la metodología de *Phage Display*) específicos contra diversas proteínas proinflamatorias (citoquinas) involucradas en la inmunopatogenia de la psoriasis (TL1A) y la dermatitis atópica (IL-4, IL-13, IL-31).

La capacidad de reconocimiento por su antígeno fue evaluada, mediante *ELISA* (hTL1A, mTL1A, IL-4, IL-13, IL-31) y citometría de flujo (hTL1A). Se puso a punto un ensayo de unión entre hTL1A y su receptor hDR3 (mediante *ELISA*) que se utilizó para evaluar la capacidad inhibitoria de los nanoanticuerpos generados.

Se logró seleccionar nanoanticuerpos específicos por su molécula *target* en todos los casos de estudio luego de realizar varias rondas de selección. Sin embargo, no se logró determinar su unión de forma efectiva por medio de citometría de flujo ni se observó inhibición en *ELISA*.

Finalmente, se generaron bancos celulares de linajes (TF-1, U87-MG, DH82) a utilizar en futuros ensayos de actividad biológica *in-vitro* con los nanoanticuerpos obtenidos en este trabajo.

Este trabajo sienta las bases para el desarrollo de productos biológicos tópicos para enfermedades de piel basados en nanoanticuerpos.

Palabras clave

Nanoanticuerpos, *nanobody*, V_HHs, psoriasis, dermatitis atópica, *ELISA*, *panning*, *Phage Display*, fagos, TL1A, DR3, interleuquinas, IL-4, IL-13, IL-31, transfección, citometría de flujo, TF-1, U-87MG, DH-82.

Abreviaciones

AB- anticuerpo, del inglés: *antibody*

ADN - Ácido desoxirribonucleico (del inglés: *deoxyribonucleic acid*)

ADNasa - Desoxirribonucleasa (del inglés: *deoxyribonuclease*)

APCs- Células presentadoras de antígeno (del inglés: *antigen presenting cells*)

ARN - Ácido ribonucleico (del inglés: *Ribonucleic acid*)

ARNm - Ácido ribonucleico mensajero (del inglés: *Ribonucleic acid*)

BCA - Ácido bicinconínico (del inglés: *bicinchoninic acid*)

bp - par de bases (del inglés: *base pair*)

BSA - Seroalbúmina bovina (del inglés: *bovine serum albumin*)

CDR - Regiones determinantes de complementariedad (del inglés: *complementarity determining region*)

CH1 - Primer dominio canónico constante de cadena pesada (del inglés: *first constant domain in the heavy chain*)

c.s.p. - Cantidad suficiente para

CV - volumen de columna (del inglés: *column volume*)

Da - Dalton

DA- Dermatitis Atópica

DC- célula dendrítica (del inglés: *dendritic cell*)

DEPC - del inglés: *Diethyl pyrocarbonate*

DMSO - Dimetilsulfóxido

dNTP - desoxinucleótido trifosfato (del inglés: *deoxynucleotide triphosphate*)

EDTA - Ácido etilendiaminetetraacético (del inglés: *ethylenediaminetetraacetic acid*)

ELISA- ensayo inmunoabsorbente ligado a enzimas (del inglés: *enzyme-linked immunosorbent assay*)

Fab - del inglés: *fragment antigen binding*

Fc - del inglés: *fragment crystalline*

FPLC - Cromatografía líquida de proteínas de alta velocidad (del inglés: *fast protein liquid chromatography*)

Fw - del inglés: *primer forward*

g - gramos

GFP - *green fluorescent protein*

HA - Hemaglutinina

HCAb - Anticuerpos de cadena pesada (del inglés: *heavy-chain antibodies*)

HEK - (Línea celular humana, del inglés: *human embryonic kidney*)

HRP - Peroxidasa de rábano picante (del inglés: *horseradish peroxidase*)

IgG - Inmunoglobulina G

IDA - Ácido iminodiacético (del inglés: *Iminodiacetic acid*)

IMAC - Cromatografía de afinidad por iones metálicos inmovilizados (del inglés: *Immobilized metal affinity chromatography*)

IL - interleuquina

IPTG - Isopropyl- β -D-1-tiogalactopiranosido

kDa - kilo Dalton

L - litro

LB - del inglés: *Luria Broth*

M - Molar

mg - miligramo

mL - mililitro

mM - milimolar

MPM - marcador de peso molecular

mQ - Milli-Q[®] agua ultrapura de laboratorio

ng - nanogramo

NK- del inglés: *natural killer*

nm- nanómetro

OD - Densidad óptica del inglés: *Optical density*

PBMCs- Células mononucleares de sangre periférica (del inglés: *peripheral blood mononuclear cell*)

PBS - Buffer fosfato salino (del inglés: *phosphate-buffered saline*)

PCR - Reacción en cadena de la polimerasa (del inglés: *polymerase chain reaction*)

PEG - polietilenglicol

PFU- del inglés: *Plaque forming units*

pH - logaritmo negativo de la concentración de hidrogeniones de una solución

PMSF - fluoruro de fenilmetilsulfonilo (del inglés: *Phenylmethylsulfonyl fluoride*)

rpm - revoluciones por minuto

PVDF - del inglés: *polyvinylidene fluoride*

RT-PCR - del inglés: *Reverse transcription PCR*

Rv - del inglés: *primer reverse*

SALT - tejido linfoide asociado a la piel (del inglés: *skin associated lymphoid tissue*)

SB - del inglés: *Super Broth medium*

SDS - Dodecil sulfato de sodio (del inglés: *sodium dodecyl sulfate*)

SDS-PAGE - Electroforesis en gel de poliacrilamida con SDS (del inglés: *SDS polyacrylamide gel electrophoresis*)

SFB - suero fetal bovino

SOC - SOB con represión de catabolitos (del inglés *SOB with Catabolites repression*)

SOB - Medio super óptimo (del inglés *Super optimal broth*)

TAE - Tris acetato EDTA

TBS - Tris buffer salino

TEMED - del inglés: N, N, N', N'-*tetramethylenediamine*

T_H- Linfocito *helper*

TMB - 3,3', 5,5'-tetrametilbencidina

TL1A- del inglés: *TNF Like Ligand 1*

UFC - Unidades formadoras de colonias

UV - Ultravioleta

V - Voltio

xg - aceleración gravitatoria

μM - micromolar

μg - microgramo

μL - microlitro

μm - micrómetro

(m/v) - masa/volumen

(v/v) - volumen/volumen

°C - grados Celsius

Índice

1.	Introducción.....	17
1.1.	Estructura y funciones de la piel	17
1.2.	Homeostasis inmunológica de la piel	18
1.3.	Relevancia de las enfermedades cutáneas inflamatorias	19
1.4.	Psoriasis	20
1.4.1.	Interacción TL1A-DR3.....	22
1.5.	Dermatitis Atópica	25
1.6.	Interleuquinas (IL-4, IL-13 e IL-31)	25
1.7.	Fármacos convencionales para el tratamiento de enfermedades de la piel	29
1.8.	Fármacos biológicos para el tratamiento de enfermedades de la piel	30
1.9.	Anticuerpos monodominio de llama y nanoanticuerpos	34
1.9.1.	Anticuerpos de cadena pesada (HCAbs)	34
1.9.2.	Nanoanticuerpos.....	36
1.10.	<i>Phage Display</i>	39
1.10.1.	Características Generales	39
1.10.2.	Biología de Fagos Filamentosos.....	39
1.10.3.	Generación de una biblioteca de V _H Hs.....	42
1.10.4.	Selección de nanoanticuerpos.....	43
2.	Objetivos	47
2.1.	Objetivo general	47
2.2.	Objetivos específicos.....	47
3.	Metodología.....	48
3.1.	Materiales.....	48
3.1.1.	Material biológico	48
3.1.2.	Vectores plasmídicos.....	48
3.1.3.	Nanoanticuerpos.....	49
3.1.4.	Anticuerpos	49
3.1.5.	Citoquinas	49
3.1.6.	Soluciones.....	50
3.2.	Métodos	52
3.2.1.	Procedimientos generales	52

3.2.1.1.	Generación de células electrocompetentes	52
3.2.1.2.	Transformación de bacterias por electroporación.....	52
3.2.1.3.	Electroforesis de proteínas en gel <i>SDS-PAGE</i>	53
3.2.1.4.	Precultivos	54
3.2.1.5.	Stock de glicerol.....	54
3.2.1.6.	Electroforesis de ácidos nucleicos	55
3.2.1.7.	Cuantificación de ácidos nucleicos	55
3.2.1.8.	Precipitación de ácidos nucleicos.....	55
3.2.1.9.	Técnica de ELISA	56
3.2.1.10.	Proceso de <i>Panning</i>	57
3.2.1.11.	Amplificación de outputs	58
3.2.1.12.	Titulación de outputs.....	59
3.2.1.13.	Clonaje en vector pET-28a.....	60
3.2.1.13.1.	Clonaje de <i>output</i> en vector pET-28a.....	60
3.2.1.13.2.	Clonaje de secuencias en vector pET-28a	61
3.2.1.14.	Secuenciación	63
3.2.1.15.	Generación de una biblioteca de Nanoanticuerpos.....	64
3.2.1.16.	Expresión de proteínas a pequeña escala y matraces.....	68
3.2.1.17.	Sonicación pequeña y gran escala	69
3.2.1.18.	Purificación de proteínas.....	69
3.2.1.19.	Cuantificación proteica	71
3.2.1.19.1.	BCA.....	71
3.2.1.19.2.	UV.....	72
3.2.1.20.	Chequeo de identidad por <i>Western Blot</i>	72
3.2.1.21.	Descongelado de líneas celulares	73
3.2.1.22.	Tripsinización de células adherentes.....	74
3.2.1.23.	Generación de una bibl. de fagos a partir de una bibl. de fagémidos	74
3.2.1.24.	Generación de sobrenadantes de nanoanticuerpos en pComb3X y pET-28a para su uso en <i>Screening</i>	75
3.2.2.	Expresión transitoria de hTL1A en células HEK-293 y Citometría de Flujo.....	76
3.2.2.1.	Transfección por Lipofectamina	76
3.2.2.2.	Marcaje y análisis por citometría de flujo	77
3.2.3.	Generación de un banco celular de la línea TF-1, DH82 y U87-MG para ensayos de actividad.....	78

4.	Resultados y discusión	79
4.1.	Proyecto TL1A.....	79
4.1.1.	Optimización la expresión, inducción y purificación de los nanoanticuerpos en sistemas procariotas	79
4.1.2.	Producción a escala de matraz 250 mL de los nanoanticuerpos	85
4.1.3.	Optimización de la expresión, inducción y purificación de la proteína hTL1A en sistemas procariotas	90
4.1.4.	Producción de hTL1A a escala de matraces 250 mL	94
4.1.5.	Reconocimiento de hTL1A con nanoanticuerpos purificados.....	97
4.1.6.	Interacción hTL1A y su receptor hDR3 en formato de <i>ELISA</i>	100
4.1.7.	Inhibición de la interacción hTL1A-hDR3 en formato de <i>ELISA</i>	104
4.1.7.1.	Grupo G1	104
4.1.8.	Rondas de <i>Panning</i> contra hTL1A.....	106
4.1.8.1.	Grupo G2	106
4.1.8.2.	Grupo G3	109
4.1.9.	Interacción cruzada de los nanoanticuerpos α -hTL1A con mTL1A.....	113
4.1.10.	Desarrollo de transformantes transitorias de HEK-293 expresando hTL1A	116
4.1.11.	Banco de células del sistema inmune TF-1, U87-MG y DH82.....	119
4.2.	Proyecto Interleuquinas	120
4.2.1.	Inmunización y generación de una biblioteca de nanoanticuerpos anti-IL4, IL13 e IL31.	120
4.2.2.	Selección, <i>screening</i> y análisis de nanoanticuerpos generados a partir de una biblioteca de fagos contra IL-4h, IL13-m e IL31-c	120
5.	Conclusiones.....	126
6.	Perspectivas a futuro	128
7.	Referencias Bibliográficas	130
8.	Anexo	139

Índice de figuras

Fig. 1.	18
Fig. 2.	19
Fig. 3.	20
Fig. 4.	23
Fig. 5.	24
Fig. 6.	27
Fig. 7.	28
Fig. 8.	31
Fig. 9.	34
Fig.10.	35
Fig.11.	40
Fig.12.	40
Fig.13.	43
Fig.14.	45
Fig.15.	62
Fig.16.	80
Fig.17.	82
Fig.18.	82
Fig.19.	83
Fig.20.	85
Fig.21.	86
Fig.22.	87
Fig.23.	88
Fig.24.	89
Fig.25.	91
Fig.26.	92
Fig.27.	93
Fig.28.	95
Fig.29.	96
Fig.30.	98
Fig.31.	99
Fig.32.	100
Fig.33.	101
Fig.34.	103
Fig.35.	105
Fig.36.	107
Fig.37.	108
Fig.38.	109
Fig.39.	111
Fig.40.	112
Fig.41.	112

Fig.42.	114
Fig.43.	116
Fig.44.	117
Fig.45.	119
Fig.46.	122
Fig.47.	124
Fig.48.	125
Fig.1. Anexo	138
Fig.2. Anexo	139
Fig.3. Anexo	140
Fig.4. Anexo	140

Índice de tablas

Tabla 1.	33
Tabla 2.	53
Tabla 3.	54
Tabla 4.	57
Tabla 5.	58
Tabla 6.	61
Tabla 7.	62
Tabla 8.	63
Tabla 9.	65
Tabla 10.	69
Tabla 11.	77
Tabla 12.	90
Tabla 13.	97
Tabla 14.	106
Tabla 15.	110
Tabla 16.	115
Tabla 17.	121
Tabla 18.	123
Tabla 19.	125
Tabla 1. Anexo.	138

1. Introducción

1.1. Estructura y funciones de la piel

La piel es un órgano complejo que provee la principal barrera frente a agentes externos los cuales amenazan el bienestar de nuestro organismo, tales como patógenos, productos químicos tóxicos, rayos UV del Sol y lesiones mecánicas (1). Con una superficie aproximada de 1,85 m², la piel es el órgano más grande de la mayoría de los mamíferos. Además, la misma ejecuta funciones vitales como la regulación de la temperatura corporal, la prevención de pérdida de agua excesiva, la eliminación de metabolitos de desecho a través del sudor y la producción de pigmentos contra la luz solar (2). La piel lleva a cabo procesos metabólicos y secretores que producen una serie de biomoléculas con funciones esenciales para el organismo, incluidos lípidos, proteínas, glicanos, y hormonas (3).

Anatómicamente la piel consta de una elaborada estructura compuesta por tres capas y anexos cutáneos (pelo, uñas y glándulas sudoríparas, sebáceas y mamarias). Las capas que la componen son la epidermis, la dermis y la hipodermis o tejido subcutáneo. A muy grandes rasgos, la capa exterior, denominada la epidermis, consta de una constelación específica de células conocidas como queratinocitos, que sintetizan queratina, una proteína larga y filiforme con una función protectora. La capa intermedia, la dermis, está formada fundamentalmente por la proteína estructural fibrilar conocida como colágeno. La dermis se encuentra sobre el tejido subcutáneo, o panículo, que contiene pequeños lóbulos de células grasas conocidas como lipocitos. (3)

Como órgano de barrera, y primera línea de defensa del organismo, el compartimento cutáneo contiene diversas células inmunitarias, aún en condiciones de homeostasis. (Ver Fig. 1.) Dichas células se organizan coordinadamente formando lo que se denomina: “tejido linfoide asociado a la piel” (*SALT*), que incluye células dendríticas (*DC*), macrófagos, *NKs*, neutrófilos, mastocitos, linfocitos B y T, algunos tipos de linfocitos innatos y queratinocitos (4). Este sistema modula la cascada de respuestas inmunitarias locales, protegiendo al cuerpo contra microorganismos extraños y desempeñando un papel importante en la fisiopatología de enfermedades inflamatorias como los trastornos autoinmunitarios (como la psoriasis) y de hipersensibilidad (como la dermatitis atópica) (5, 6). Dichas enfermedades

tienen mecanismos patogénicos generalmente mediados por linfocitos T y responden a terapia inmunosupresora o antiinflamatoria.

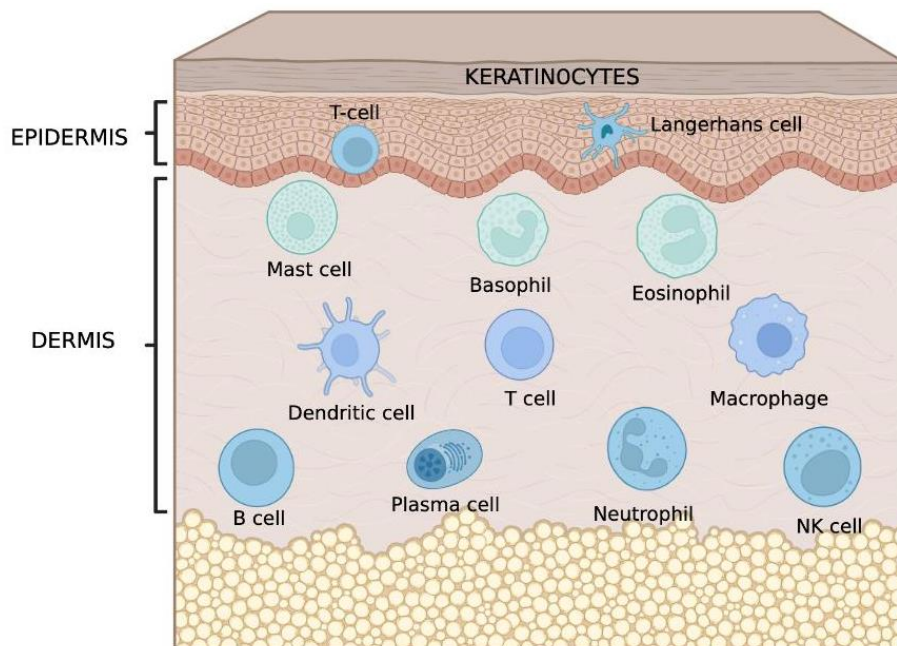


Fig. 1. Representación esquemática de la distribución de las células inmunitarias que forman el tejido linfoide asociado a la piel (SALT) en la epidermis y la dermis de la piel. Obtenido de (7).

1.2. Homeostasis inmunológica de la piel

La homeostasis de la piel se basa en un fino equilibrio entre los diferentes componentes celulares y de éstos con los microorganismos comensales presentes en ella. (7)

El principal grupo celular considerado responsable de la homeostasis inmunológica de la piel son los linfocitos T $CD4^+$ o *Helper* (T_H). Estos linfocitos pueden presentar distintos fenotipos, siendo los más comunes los: T_H1 , T_H2 , T_H17 y $TRegs$. Al ocurrir un desbalance inmunitario que favorece el reclutamiento de un fenotipo particular frente a otro, de forma crónica, se desencadenan los síntomas de la enfermedad. En la figura (Ver Fig. 2) se representan las asociaciones entre los distintos fenotipos de respuesta T *helper* y las enfermedades que pueden desencadenar en la piel. (7)

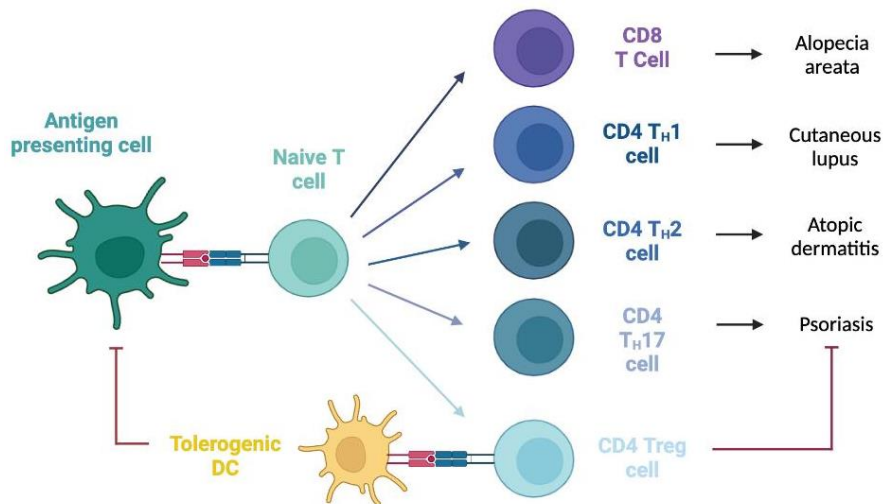


Fig. 2. Ilustración representando la diferenciación de una célula T *naive* a sus diferentes fenotipos, y las enfermedades de piel asociadas a cada uno de ellos. Se visualizan las células T CD8+ responsables de su actividad citotóxica y las T CD4+ *Helper* (T_H1 , T_H2 , T_H17), encargadas de secretar las principales citoquinas proinflamatorias desencadenantes de la sintomatología de dichas enfermedades. Por último, se observan las T CD4+ *Treg* o reguladoras, responsables de secretar sustancias que ayudan principalmente a reducir la respuesta y aminorar los síntomas proinflamatorios. (7)

1.3. Relevancia de las enfermedades cutáneas inflamatorias

Mantener la integridad de la piel y sus anexos es una de las prioridades de supervivencia para el humano moderno, no solo porque es la barrera principal para los ataques externos, o por las múltiples funciones que cumple en el organismo, sino también debido al impacto social y psicológico que tienen durante su vida útil (8). Se estima que un 60% de los pacientes presentará una o más de las siguientes afecciones psicológicas debido a diversas enfermedades asociadas a la piel: depresión, ansiedad, pensamientos suicidas, suicidio, ausentismo laboral, entre otras (9).

Por estas razones, según datos del *Global Burden of Disease* (GBD), las enfermedades de la piel constituyen la cuarta causa de discapacidad a nivel mundial, especialmente en las regiones de escasos recursos. Cabe destacar que al menos un 30% de la población va a padecer alguna patología cutánea a lo largo de su vida (10).

Dada la multidimensionalidad que presentan estas afecciones, los costos asociados son de muy alta envergadura, abarcando tanto costos directos, en fármacos, visitas médicas y la baja productividad laboral (9).

Las principales enfermedades inflamatorias de la piel son la psoriasis, la dermatitis atópica, la alopecia, y el vitiligo. En esta tesis se busca desarrollar alternativas terapéuticas para personas con psoriasis y dermatitis atópica, por lo que ahondaremos en estas enfermedades a continuación (9).

1.4. Psoriasis

La psoriasis es una enfermedad crónica inflamatoria, de origen autoinmune, que afecta distintas áreas de la piel. Su prevalencia a nivel mundial es de un 2% aunque suele variar dependiendo de las características como etnia, género y edad de población afectada. En los últimos años, los avances en genética, microbiología, inmunología y modelos animales han revelado la compleja interacción entre los factores hereditarios y micro ambientales que impulsan el desarrollo de la inflamación psoriásica (10).

La sintomatología más frecuente es la inflamación, descamación, sequedad y picazón. (11) Puede desarrollarse en cualquier parte del cuerpo, pero es más común que aparezca en codos, rodillas y cuero cabelludo (12) (Ver Fig. 3.).

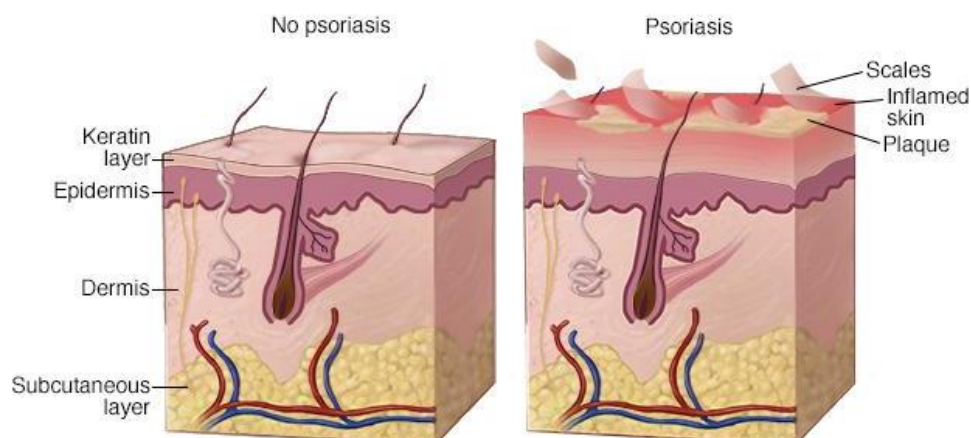


Fig. 3. Ilustración representando las diferentes capas de la piel. A la izquierda se representa un corte de piel sana. A la derecha, se representa un corte de piel afectada por psoriasis. (12)

Existen diversos tipos de psoriasis, presentando diferencias en la manifestación de la sintomatología clínica asociada. Las más comunes son la psoriasis *vulgaris* (en el 90% de los casos), seguido por la psoriasis inversa, psoriasis de *Guttate* y psoriasis pustular. Por último, la artritis psoriática, no solamente afecta a la piel sino a estructuras internas como las articulaciones. (12)

La patogénesis de la enfermedad se encuentra relacionada a una gran inflamación sostenida que deriva en la proliferación incontrolada de queratinocitos, y en una diferenciación disfuncional de los mismos. Análisis histológicos de placas psoriáticas, muestran una hiperplasia de la epidermis, con infiltración de diversas células del sistema inmune, como células dendríticas, macrófagos, células T y neutrófilos, además, la neovascularización (o formación de nuevos vasos sanguíneos) tiene un rol de importancia en este proceso. (12)

Un descontrol en la respuesta inmune innata y adaptativa son los responsables de sostener la gran respuesta inflamatoria presente en la psoriasis. Una activación en el sistema inmune innato debido a señales de daño endógenas, así como citoquinas presentes en el entorno celular y la presencia de células T efectoras son las principales causas. (12)

El eje IL-23/IL-17 juega un rol muy importante en la aparición y perpetuación de la enfermedad, y es común a la patogenia de todos los tipos de psoriasis (13). Si bien el mecanismo que desencadena la enfermedad puede ser variable entre pacientes, se sabe que en la mayor parte de los casos péptidos antimicrobianos, en particular la catelicidina (LL37), es sobre-expresada en las lesiones psoriásicas, y al unirse al ADN propio actúan como señal de daño celular, estimulando a las células dendríticas residentes en la piel a través de TLR9 (14, 15). Además, sirven como autoantígeno presentado a las células T CD4+ por moléculas del complejo mayor de histocompatibilidad de clase II en las células dendríticas.

Las células dendríticas convencionales y plasmocitoides así activadas (16) producen citoquinas inflamatorias, incluida la IL-23, promoviendo la activación y proliferación de células T CD4+ de fenotipo Th17. La unión de IL-23 al receptor heterodimérico IL-23R/IL-12R β 1 expresado por los linfocitos T *naive*, activa la señalización de STAT3 dependiente de Tyk2 y Jak2, que promueve la expansión de las células Th/Tc17 que secretan IL-17A, IL-17F y TNF (13). La IL-17A también puede ser producida por células linfoides innatas del grupo 3 (ILC3) y por células T $\gamma\delta$ y $\alpha\beta$ que también abundan en las lesiones psoriáticas.

La IL-17A actúa sobre variados blancos celulares, incluidos los queratinocitos, los neutrófilos, las células endoteliales y los fibroblastos, estimulando la producción de varios péptidos antimicrobianos, quemoquinas y citoquinas proinflamatorias y proliferativas que generan un *loop* de retroalimentación positiva contribuyendo a la hiperproliferación epidérmica, acumulación intraepidérmica de neutrófilos e infiltrados dérmicos de células inflamatorias, característicos de la piel psoriática lesionada (17).

1.4.1. Interacción TL1A-DR3

TL1A (por sus siglas en inglés *TNF-like ligand 1A*) es una citoquina proinflamatoria perteneciente a la superfamilia de proteínas del tipo *TNF* (*TNFSF15* o *VEGI-251*), involucradas en la inmunopatogenia de diversas enfermedades del sistema inmune. Fue descubierta y caracterizada por primera vez en 2002 y ha sido objeto de estudio desde entonces, debido a su estrecho relacionamiento en la modulación y desarrollo del sistema inmune. (18, 19) (Ver Fig. 4.)

Es una proteína transmembrana del tipo II, la cual puede presentarse tanto en su forma anclada a membrana, como soluble en entorno extracelular (por clivaje de proteasas en sus exodominio). Este ligando tiene como receptor funcional a DR3 (por sus siglas en inglés *death domain receptor 3*), el cual comparte gran homología con el resto de los receptores de esta familia. (18, 19)

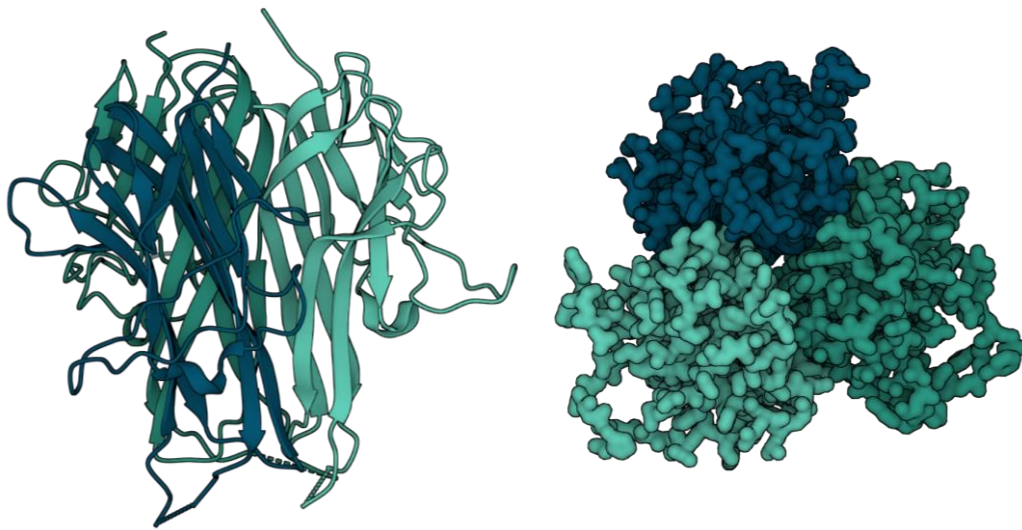


Fig. 4. Ilustración de la proteína hTL1A. Se muestran en diferentes colores las subunidades del homotrímero (21 kDa cada una). Su estructura se compone por un arreglo tridimensional equidistante en forma de triángulo, el cual permite su inserción en la estructura de “pocillo” presente en su receptor celular DR3. Se compone principalmente de hojas betas antiparalelas, con zonas de giros sin estructura definida. Imágenes tridimensionales obtenidas de RCSB PDB *Entry*: #2O0O.

Si bien originalmente TL1A fue descrito como un factor endotelial, en los últimos años se ha demostrado que muchos tipos celulares son capaces de expresarlo. Entre estos tipos celulares, se encuentran las células presentadoras de antígenos (*APCs*, como las dendríticas y macrófagos), linfocitos, células plasmáticas y fibroblastos. Por otro lado, la expresión de DR3 está en gran parte restringida a los linfocitos activados. (18)

La unión de TL1A a linfocitos activados que expresando DR3, ha demostrado ser capaz de amplificar los principales fenotipos de respuesta CD4+, T_H1 , T_H17 , T_H2 y T_H9 mediante la activación de cascadas de señalización intracelular y factores de transcripción del tipo *NF- κ B* (20). (Ver Fig. 5.)

Se ha descrito que la expresión de TL1A aumenta tanto en el suero como en los tejidos inflamados crónicamente a raíz del desencadenamiento de enfermedades autoinmunes como la enfermedad inflamatoria intestinal (EII), la artritis reumatoidea (AR) y la espondilitis anquilosante (*AS*). (20)

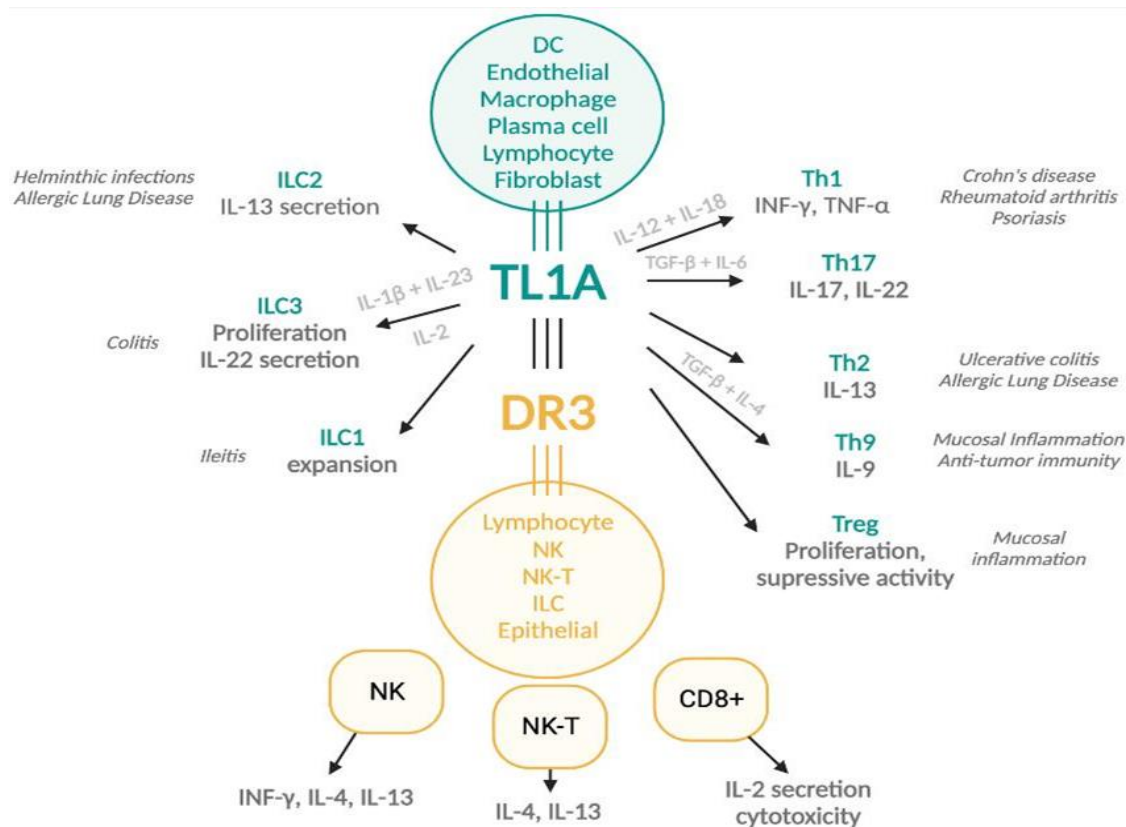


Fig. 5. Ilustración representando los efectos de la interacción entre TL1A y DR3 en la promoción de distintas respuestas inmunes que involucran la activación de diversos grupos celulares y la consecuente secreción de determinado perfil de citoquinas (20).

Gracias a estas observaciones, se ha postulado y demostrado que la interacción TL1A/DR3 tiene un rol importante en la perpetuación de respuestas inmunes aberrantes causantes de diversas enfermedades inflamatorias. Por estas razones, el bloqueo de esta interacción con diferentes estrategias se ha propuesto como potencial tratamiento de dichas enfermedades (20).

Concretamente en placas psoriáticas, los niveles de expresión de TL1A y DR3 por las células ya mencionadas, aumentan significativamente y el eje DR3/TL1A promueve la activación y proliferación de las células T CD4⁺ del tipo *T_H17*. A su vez, la TL1A soluble sinergiza con otras interleuquinas (como la IL-23) para estimular la producción de IL-17, con las consecuencias descritas en el apartado anterior (20, 21). Apoyando el rol de dicho eje en la psoriasis, se ha demostrado que el bloqueo de TL1A con anticuerpos neutralizantes (bloqueando la interacción con DR3), administrados sistémicamente mejoran significativamente la sintomatología de la psoriasis en modelos animales. (19, 22)

1.5. Dermatitis Atópica

La dermatitis atópica (DA) es una enfermedad inflamatoria de la piel crónicamente recurrente que afecta al 2,1-4,9 % de los adultos y al 20 % de los niños de la población general afectada con la enfermedad (23, 24). Presenta diversos grados de gravedad los cuales suelen ser progresivos una vez inician los primeros síntomas que aparecen en etapas de edad temprana (niños o adolescentes) y persisten aproximadamente un 10% de los casos hasta la adultez, considerándose como dermatitis atópica severa.

Su etiología es diversa, e involucra tanto rasgos genéticos, como inmunológicos y factores ambientales. Aunque su fisiopatología no se comprende por completo, numerosos estudios demostraron que la disfunción de la barrera cutánea y la desregulación inmunitaria son los dos factores más importantes (25). Muchos autores consideran que la disfunción de la barrera cutánea es el primer paso en el desarrollo de la DA, ya que dichos defectos pueden facilitar la penetración de alérgenos y microbios en la piel, que a su vez pueden desencadenar la disfunción inmunológica.

Sin embargo, ahora también es evidente que la desregulación inmunitaria, incluida la activación de las respuestas inmunitarias de tipo 2, da como resultado un deterioro de la barrera epidérmica. (17, 23, 24, 26)

Dicha respuesta inmune tipo 2 se caracteriza por un aumento en los niveles de inmunoglobulina E (IgE) en suero, la predominancia de citoquinas como IL-4, IL-13 e IL-31, entre otras y con la sensibilización a alérgenos (27, 28).

1.6. Interleuquinas (IL-4, IL-13 e IL-31)

Las interleuquinas son un conjunto de citoquinas (proteínas que actúan como mensajeras químicas en la comunicación celular), sintetizadas por células del sistema inmune (como células dendríticas, macrófagos, linfocitos T y B) y algunas células endoteliales. Están involucradas en la modulación del sistema inmune, generando un complejo balance entre señales regulatorias de estimulación y disminución de la actividad de células inmunes efectoras (29, 30).

El perfil de citoquinas presente en determinado entorno celular modula diversos aspectos de la actividad celular como: su activación, proliferación, modulación de su actividad biológica, senescencia y muerte. Es por ello que la síntesis de citoquinas está fuertemente regulada, y un desequilibrio en este aspecto puede derivar en la aparición de diversas enfermedades inflamatorias (29).

La interleuquina 4 (IL-4) y la interleuquina 13 (IL-13) cumplen un rol fundamental en la respuesta de tipo T_H2 , originalmente relacionada a la respuesta inmune frente a helmintos y otros parásitos. Sin embargo, también tienen un rol preponderante en el desarrollo de alergias, tanto de la piel (dermatitis atópica, prurito), cómo de mucosas (rinitis, asma). Ambas interleuquinas son sintetizadas por linfocitos T CD4+ de fenotipo de T_H2 , y actúan tanto sobre linfocitos B como T (31–33). (Ver Fig. 6.)

La interleuquina 4 por su lado, es un factor de proliferación para los linfocitos B y causa la diferenciación isotípica de los anticuerpos generados a IgE y IgG1. Además, apoya la proliferación y diferenciación de más linfocitos al fenotipo T_H2 , generando un *loop* de retroalimentación positiva de la respuesta T_H2 . Asimismo, potencia la proliferación de mastocitos, también involucrados en las alergias. Por otra parte, es capaz de inhibir la activación y función de otros fenotipos de la respuesta T, como el T_H1 y T_H17 . (33)

La interleuquina 13 es sintetizada además por células *NKT* y mastocitos y su actúa tanto en monocitos, como fibroblastos, células epiteliales y linfocitos B. Potencia la proliferación y diferenciación de los linfocitos B hacia plasmocitos, estimulando, de igual manera a la IL-4, el cambio de clase de los anticuerpos al isotipo IgE. En células epiteliales, causa un incremento en la síntesis de *mucus* y un aumento en los niveles de síntesis de colágeno por parte de los fibroblastos. (32)

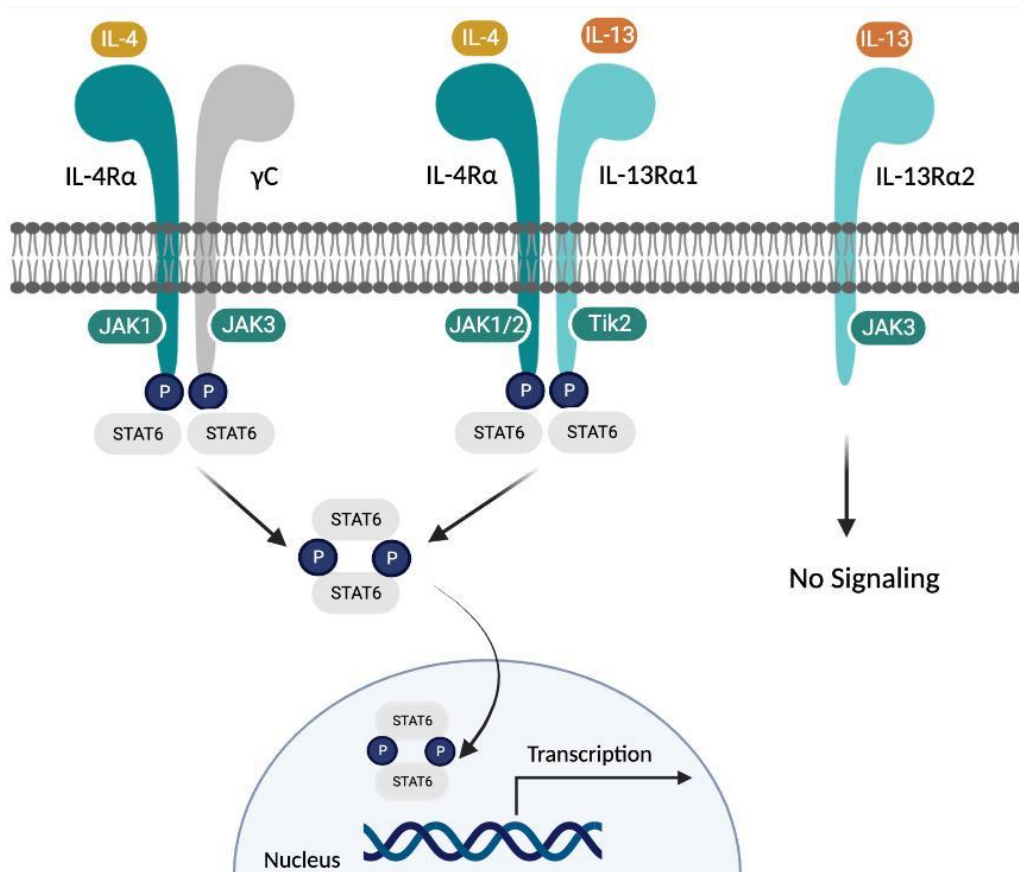


Fig. 6. Se representan las interleuquinas 4 y 13 y la estructura molecular de sus principales receptores celulares (con cada subunidad correspondiente). Se muestran además sus dominios intracelulares, y las principales proteínas involucradas en la señalización intracelular (JAK quinasas), así como los factores de transcripción trasladados al núcleo. De izquierda a derecha: receptor único para IL-4, receptor compartido con doble activación por estimulación con IL-4 e IL-13, “*decoy receptor*” para IL-13, sin función biológica determinada (34).

Por otra parte, la interleuquina 31 (Ver Fig. 7.) es producida principalmente por linfocitos T del fenotipo T_H2 (producción dependiente de IL-4) y por células dendríticas, basófilos y eosinófilos y neuronas nociceptivas de los ganglios de la raíz dorsal. Es una citoquina proinflamatoria y un factor quimiotáctico que direcciona las células polimorfonucleares, monocitos, y células T a los sitios de lesión. Además, induce la producción de otras citoquinas proinflamatorias como la IL-6, IL-16 y IL-32 (34, 35).

Su acción sobre neuronas nociceptivas de la piel se asocia con la promoción del crecimiento neuronal sensorial y en su estimulación, proporcionando una mayor sensibilidad a mínimos estímulos que inducen picazón, provocando un prurito sostenido. (35)

Por otro lado, ha sido vinculada a la disfunción epitelial presente en la DA, ya que induce el arresto del ciclo celular de los queratinocitos, lo que da como resultado una proliferación reducida, derivando en un desarrollo cutáneo atípico. También se asocia con una profunda inhibición de la expresión de las proteínas filagrina, involucrina y citoqueratina-10 fundamentales en la diferenciación de los queratinocitos y en el mantenimiento de la barrera cutánea (35).

También, se ha descrito que la IL-31 se sobreexpresa en lesiones provocadas por agentes externos (como la radiación ultravioleta y estrés oxidativo). (35)

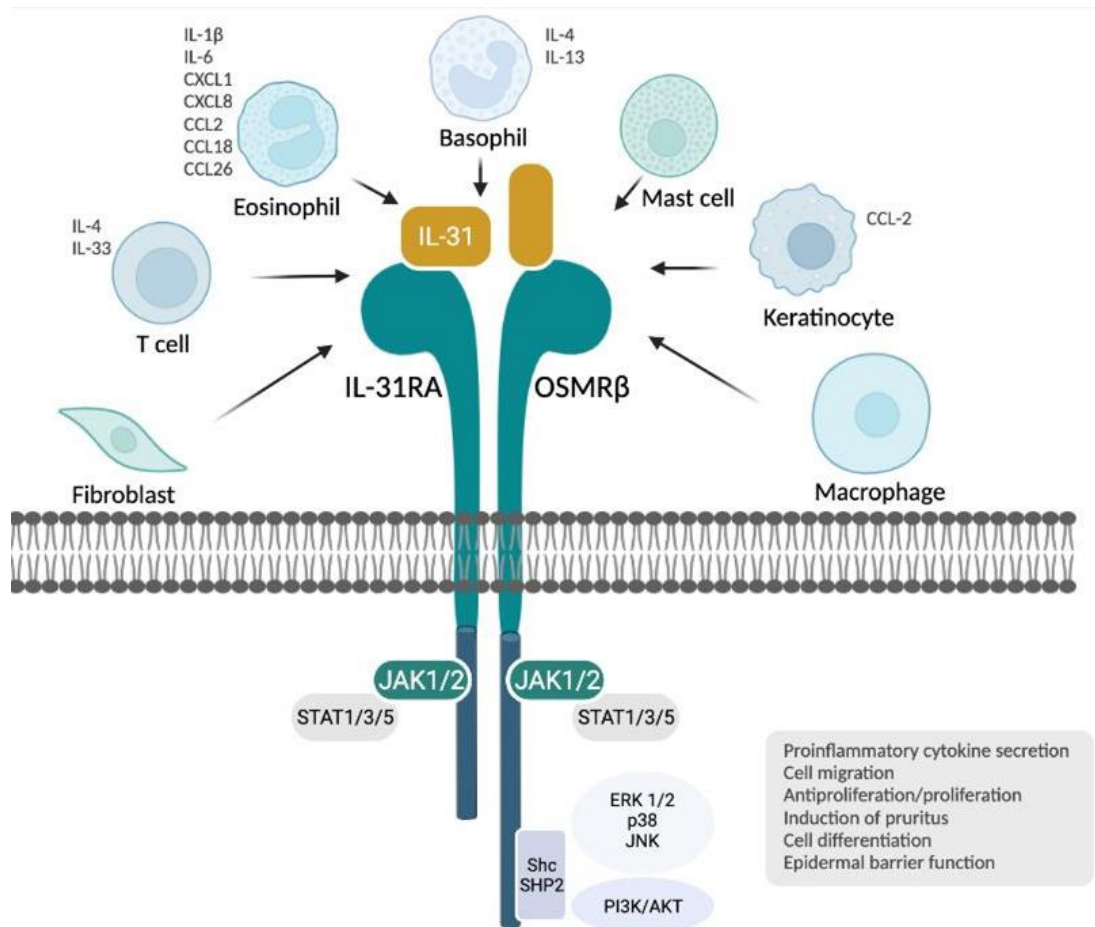


Fig. 7. Se representa la IL-31 y la estructura de su receptor celular. Es un dímero compuesto por dos dominios proteicos (IL-31RA y OSMR-beta) que actúan en conjunto para mediar la respuesta celular. En sus dominios intracelulares se detallan las proteínas responsables de la cadena de señalización y factores de transcripción (35).

1.7. Fármacos convencionales para el tratamiento de enfermedades de la piel

Una vez puesta en exposición la importancia de las enfermedades de la piel, así como algunos aspectos de su inmunopatogenia, es pertinente discutir las opciones terapéuticas actuales.

Desde hace ya bastantes décadas, la medicina cuenta para afrontar este tipo de enfermedades, con los fármacos de síntesis química, dentro de los cuales la mayor parte son inmunosupresores de amplio espectro, como los corticoides (36). Dichos fármacos son efectivos en la reducción de la sintomatología clínica de diversas enfermedades (psoriasis, dermatitis, prurito) pero presentan también una gran cantidad de desventajas o efectos colaterales perjudiciales para las personas afectadas (37) .

Sus principales efectos adversos se producen debido a que los inmunosupresores sistémicos no son selectivos, por lo que, si bien disminuyen la sintomatología, bajando los niveles de inflamación, bloquean la actividad de la mayoría de los procesos del sistema inmune, generando en muchos casos una situación de vulnerabilidad frente a amenazas externas (infecciones por virus, bacterias, reparación de tejidos dañados, e incluso cáncer). (37)

Otro de los efectos adversos de los corticoides está relacionado con el metabolismo. Son capaces de generar un aumento en los niveles de glucosa en sangre, provocar una desregulación en pacientes diabéticos, inducir la destrucción de proteínas, generar una disminución en la masa muscular e incrementar la lipólisis, aumentando la concentración plasmática de colesterol. Están involucrados también en el metabolismo del calcio, y a nivel renal provocan retención de sodio, la aparición de edemas y el aumento de la tensión arterial. (38)

En piel, producen atrofia y debilitamiento, provocando la aparición de estrías y retraso en la cicatrización de las heridas. Se han observado también la aparición de erupciones similares al acné, dermatitis alérgica de contacto y otras lesiones cutáneas relacionadas con la administración tópica (telangiectasias, rosácea, entre otras). En las vías respiratorias superiores, su administración tópica nasal o inhalatoria favorece a la aparición de infecciones oportunistas (candidiasis oral), disfonía o sangrado nasal. Finalmente, en

administraciones por vía oftálmica, producen presión ocular y cataratas frente a una administración prolongada. (38)

Afecta el sistema osteoarticular, incrementando la pérdida de calcio y fósforo en los huesos, reduciendo la absorción de calcio en los intestinos y aumentando su eliminación renal, favoreciendo así la aparición de osteoporosis y riesgo de fracturas. (38)

La dosis requerida de fármacos inmunosupresores para lograr el alivio de los síntomas es cada vez mayor, debido a que se desarrolla un fenómeno de resistencia a la acción de dichas drogas (38). Debido al carácter sostenido en el tiempo de la mayoría de las enfermedades de la piel mencionadas, este tipo de tratamiento se vuelve ineficaz a largo plazo, ya que llega un punto en el que no es posible aumentar la dosis de la droga porque los efectos secundarios terminan siendo más graves que la propia enfermedad.

1.8. Fármacos biológicos para el tratamiento de enfermedades de la piel

Por otro lado, se encuentran los fármacos biológicos, principalmente anticuerpos monoclonales de producción recombinante (39). Dichos anticuerpos (Ab, del inglés; *antibodies*) o inmunoglobulinas (Ig), son glicoproteínas que forman parte del sistema inmune adaptativo, humoral de los vertebrados que, gracias a su elevada especificidad de reconocimiento y unión a diversas moléculas *target*, han sido de gran utilidad como herramientas biotecnológicas en una amplia gama de aplicaciones en investigación y desarrollo, terapia y diagnóstico (40).

Estas biomoléculas son producidas, en su forma soluble, por células plasmáticas o plasmocitos derivadas de linfocitos B. Su estructura proteica consiste de cuatro cadenas polipeptídicas: dos cadenas livianas (L: *light chain*) idénticas y dos cadenas pesadas (H: *heavy chain*) también idénticas, que se unen mediante puentes disulfuro, generando una forma de Y. Estas cadenas están formadas por un número variable de dominios inmunoglobulina; cuya estructura característica es la de dos hojas beta (β) antiparalelas, con bucles, unidas mediante un puente disulfuro interno. Estos dominios se separan por codos y, en un caso particular, por una región bisagra, que aportan movilidad y flexibilidad a la molécula. (40)

Tanto las cadenas L como las cadenas H, poseen dominio/s constantes (C: *constant domain*) y un dominio variable (V: *variable domain*). Los dominios C se asocian a las funciones efectoras de las Ig y a las variaciones alotípicas, mientras que los dominios V conforman el sitio de unión a antígeno o parátipo, lo que varía de acuerdo con el idiotipo. El determinante antigénico con el cual interacciona el parátipo se denomina epítipo. (Ver Fig. 8.) (40)

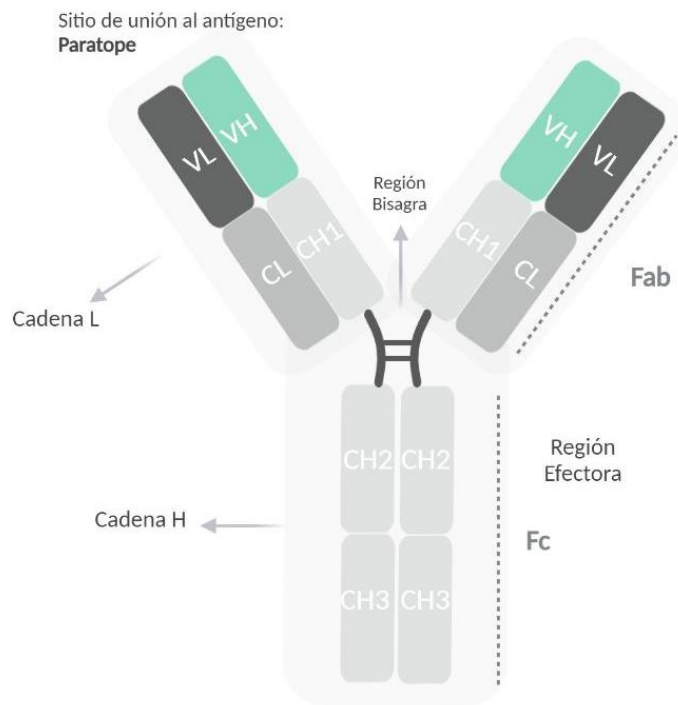


Fig. 8. Representación de un anticuerpo convencional, de clase IgG, la cual posee tres dominios CH en la cadena H. Se representan en color gris claro las partes de origen constante (tanto de la cadena H como cadena L). En gris oscuro se representa la zona variable de la cadena liviana, y en verde la zona variable de la cadena pesada. Ambas forman el parátipo, o zona de unión a antígeno. (40)

La generación de anticuerpos monoclonales específicos de moléculas involucradas en la inmunopatogenia de las enfermedades antes descritas (citoquinas, interleuquinas, receptores celulares, entre otros) les brinda un gran número de ventajas en comparación con sus análogos químicos. (40)

Los principales tratamientos promisorios actuales con anticuerpos monoclonales para tratar enfermedades inflamatorias o autoinmunes de la piel apuntan en su mayoría a incidir en la estrecha relación de comunicación entre células del sistema inmune, utilizando a los anticuerpos como herramienta para generar una activación (coestimulación) y/o supresión de alguna de dichas interacciones. (40)

Actualmente existen tratamientos de administración sistémica de monoclonales para pacientes con enfermedad severa (12, 41), en donde la necesidad de aminorar la sintomatología es fundamental para la calidad de vida de la persona afectada. Dichos fármacos suelen ser específicos, presentan mayor eficacia y tienden a generar menos efectos secundarios a largo plazo, en comparación con sus análogos químicos (42).

Sin embargo, aún existen algunas limitaciones con respecto al uso de anticuerpos monoclonales, que se resumen en 3 puntos a continuación:

En primer lugar, sus costos de producción suelen ser elevados, ya que requieren de sistemas biológicos de producción complejos, capaces de generar modificaciones post-traduccionales específicas (como las glicosilaciones, en células de mamífero), claves para su actividad biológica (43, 44). Esto implica que aún se sigan buscando formas de realizar escalados de producción sostenibles a largo plazo, y con posibilidades de ampliar el acceso de dichos fármacos al público general, sin perder en el proceso su efectividad.

En segundo lugar, debido a su naturaleza biológica, los monoclonales suelen ser inestables en la mayoría de las formulaciones de uso tópico (aplicaciones *in-situ*) que actualmente se utilizan para los fármacos convencionales (crema, ungüento o gel). Además, debido a su gran tamaño, su penetrabilidad en las capas de la piel es muy reducida, impidiendo que pueda interaccionar efectivamente con su molécula *target* -que suele encontrarse en la dermis y capas profundas de la epidermis- causando una disminución en la actividad biológica. (44)

Finalmente, si bien los posibles efectos secundarios son significativamente menores a los de las drogas químicas, gracias a la alta especificidad de los anticuerpos por sus moléculas *target*, la necesidad de administración sistémica bloquea a la molécula *target* en órganos no afectados por la enfermedad provocando un desequilibrio inmune en zonas ilesas, lo que puede generar daño o susceptibilidad a infecciones o procesos mutagénicos. Por dicha razón, los monoclonales suelen ser indicados en casos de enfermedad grave y en pacientes sin comorbilidades. (44)

En el caso de la psoriasis existen diferentes fármacos biológicos de administración sistémica (Ver Tabla. 1.) aprobados por la FDA desde hace más de una década (45, 46). La mayoría de los monoclonales que existen, están dirigidos a bloquear la acción de citoquinas pro-inflamatorias como el TNFalfa, y citoquinas relacionadas a la respuesta Th17 (IL23, IL17A).

Tabla. 1. Principales fármacos biológicos propuestos para el tratamiento de enfermedades de la piel con carácter inmunológico para psoriasis y dermatitis atópica.

Droga	Enfermedad	Target	Administración	Estatus
Alefacept	Psoriasis	LFA-3	Intramuscular	Retirado 2011
Efalizumab	Psoriasis	CD-11a	Subcutaneo	Retirado 2009
Etanercept	Psoriasis	TNF-Alfa	Subcutaneo	Aprobado 2004
Infliximab	Psoriasis	TNF-Alfa	Intravenoso	Aprobado 2006
Adalimumab	Psoriasis	TNF-Alfa	Subcutaneo	Aprobado 2008
Ustekinumab	Psoriasis	IL-12/IL-23	Subcutaneo	Aprobado 2009
Secukinumab	Psoriasis	IL-17A	Subcutaneo	Aprobado 2015
Ixekizumab	Psoriasis	IL-17A	Subcutaneo	Aprobado 2016
Brodalumab	Psoriasis	IL-17A	Subcutaneo	Aprobado 2017
Guselkumab	Psoriasis	IL-23	Subcutaneo	Aprobado 2017
Tildrakizumab	Psoriasis	IL-23	Subcutaneo	Aprobado 2018
Risankizumab	Psoriasis	IL-23	Subcutaneo	Aprobado 2019
Dupilumab	Dermatitis	IL-4Ra	Subcutaneo	Aprobado 2022
Tralokinumab	Dermatitis	IL-13	Subcutaneo	Aprobado 2021
Lebrikizumab	Dermatitis	IL-13	Subcutaneo	Fase Clínica III
Nemolizumab	Dermatitis	IL-31	Subcutaneo	Aprobado 2019

En el caso de la dermatitis, los fármacos biológicos se dirigen principalmente a bloquear el eje de interacción IL-4/IL-13 (25, 47). Dupilumab es el fármaco de mayor eficacia y relevancia en la actualidad, debido a su versatilidad de inhibir tanto la interacción con la IL-4 como la IL-13, uniéndose como *target* al receptor compartido entre ambas moléculas (IL-4RA). (27, 32, 48)

1.9. Anticuerpos monodominio de llama y nanoanticuerpos

1.9.1. Anticuerpos de cadena pesada (HCAbs)

En el año 1980 investigadores de la Universidad Libre de Bruselas (VUB) descubrieron inmunoglobulinas similares a IgG, con un peso molecular aproximado de 100 kDa en sueros de camello (*Camelus dromedarius*). A diferencia de sus análogos convencionales, estas inmunoglobulinas se componen de un homodímero de cadenas pesadas (*H: Heavy*) pero carecen de cadenas livianas (*L: Light*). Por dicha razón, se los denominó anticuerpos de cadena pesada (HCAbs: *Heavy-Chain Antibody*) (49, 50). (Ver Fig. 9). Este tipo de anticuerpos también fue encontrado en los géneros restantes de la familia: *Lama*, *Vicugna* y algunos peces cartilagosos (51). En *Lama spp.* los HCAbs del tipo IgG2 e IgG3 comprenden aproximadamente el 45% de las IgG séricas totales. En *Camelus spp.* este valor asciende al 75% (52, 53).

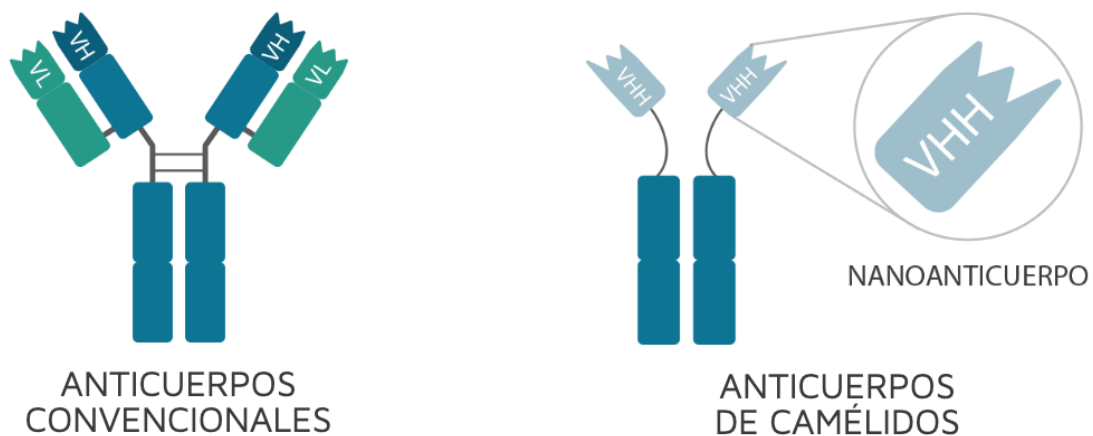


Fig. 9. Comparación ilustrativa de anticuerpos convencionales (izquierda) con anticuerpos derivados de camélidos (derecha). Se muestran en cada caso las estructuras básicas de inmunoglobulina. Las cadenas pesadas representadas en azul, y las cadenas livianas representadas en verde agua. Se realiza una ampliación del dominio de unión a antígeno en los anticuerpos de camélidos (V_{HH}), el cual en su forma recombinante es denominado nanoanticuerpo.

Se componen de dos dominios estructurales: CH_2 y CH_3 y uno variable, que comprende su región de reconocimiento de antígeno y se encuentra en el extremo N-terminal de la cadena pesada (H) del homodímero. A este dominio se lo denomina V_{HH} (54).

Al igual que los dominios VH de los anticuerpos convencionales, los V_{HH} están compuestos por cuatro regiones con secuencias altamente conservadas denominadas *framework* 1-4

(FR) con un rol importante en la preservación de la estructura, plegamiento y estabilidad de los anticuerpos, y por tres regiones hipervariables determinantes de complementariedad (CDR) que le confieren variabilidad en la capacidad de reconocimiento de antígenos (55, 56).

Cabe destacar que el repertorio completo de V_HHs expresado por linfocitos de una llama, se puede amplificar por *PCR*, utilizando 3 cebadores *forwards* (denominados VH1, VH3 y VH4) que hibridan en el *framework* 1, y uno *reverse* que hibrida en una región conservada de los segmentos J (55).

Su estructura es de dominio Ig formado por dos hojas beta, una de cuatro cadenas y otra de cinco. Dentro de este dominio, las tres regiones hipervariables (CDRs) se agrupan en un mismo extremo, en los bucles que conectan las cadenas beta, protruyendo del dominio y participando así en el reconocimiento molecular del antígeno (56). (Ver Fig. 10.)

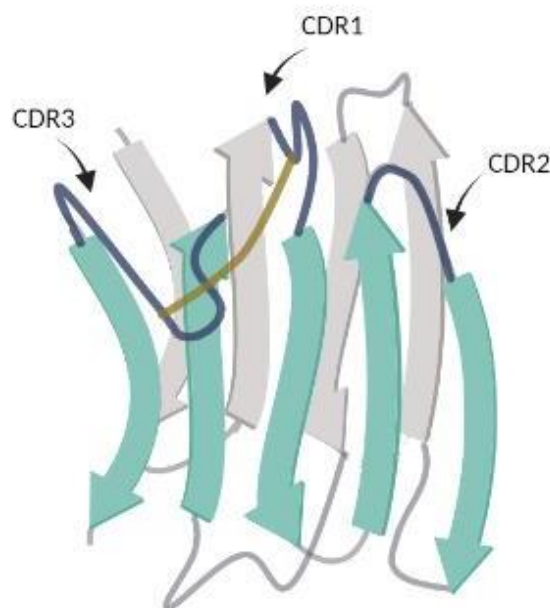


Fig. 10. A- Ilustración mostrando el arreglo tridimensional típicamente adoptado por el dominio V_HH, tanto en su forma de HCAs como en su forma recombinante (*Nanobody*). Se muestran en color los bucles protruyentes de las regiones de reconocimiento de antígeno reconocidos como CDR1, CDR2 y CDR3 (cual presenta la mayor extensión). En amarillo se muestra el enlace de estabilización entre CDR3 y CDR1 (56).

Otra diferencia entre los HCAs respecto a sus contrapartes convencionales es la extensión que presenta la región hipervariable CDR3, que en promedio puede ser hasta un 50% más

larga. Dicha extensión implica una mayor flexibilidad, lo cual puede ser contraproducente para la estabilidad de la unión. Sin embargo, este problema se resuelve en V_HHs de camélidos mediante la aparición de un puente disulfuro entre *CDR3* y *CDR1*, que estabiliza el dominio de unión (56, 57).

1.9.2. Nanoanticuerpos

El dominio de unión al antígeno de los anticuerpos de cadena pesada (V_HH), expresado de forma recombinante, se denomina nanoanticuerpo. Es el fragmento funcional más pequeño que existe y posee la misma capacidad de unión que la molécula completa de donde derivan (58).

Se componen de aproximadamente 120 aminoácidos, poseen un peso molecular de 12 a 15 kDA y su tamaño es de 4 x 2.5 nm. Debido a estas características estructurales, los nanoanticuerpos presentan numerosas ventajas respecto a los anticuerpos convencionales (59). En primer lugar, son capaces de reconocer antígenos inaccesibles a sus contrapartes convencionales principalmente por poseer un sitio de unión a antígeno convexo, con grandes bucles protruyentes, formado por sus CDRs (60, 61). Su pequeño tamaño les permite también mayor penetrabilidad en tejidos, presentándose como una buena alternativa para el tratamiento de tumores sólidos con baja accesibilidad para moléculas grandes como los mAbs, y en el caso de la piel, en el cual se deben atravesar varias capas de queratinocitos unidos por desmosomas y fuertes uniones adherentes, con una densa matriz extracelular

Además, poseen una vida media sérica corta de aproximadamente 2 horas debido a que por su tamaño son rápidamente eliminados del sistema sanguíneo a través del filtro renal el cual posee un *cut-off* de aproximadamente 60 kDa (59). Esto los hace un buen vehículo de diagnóstico por imagenología siendo conjugados a moléculas marcadas para su detección. Sin embargo, en el caso de su uso como agente terapéutico de administración sistémica, existe un creciente interés de conjugarlos a otras proteínas, aumentando su vida media sérica. En el caso de administraciones localizadas en piel (en formulaciones tópicas), que buscan la disminución de efectos secundarios en órganos internos, su vida media corta en suero es una ventaja, porque en el caso de llegar a torrente sanguíneo (se espera que sea en bajas concentraciones), se eliminarán rápidamente por vía urinaria.

Otra ventaja de los nanoanticuerpos, frente a los anticuerpos monoclonales o sus fragmentos, es su alta estabilidad fisicoquímica. Presentan valores de temperatura de *melting* proteico (temperatura a la cual el 50% de las moléculas se encuentran desnaturalizadas) de 60-80 °C, e incluso pueden conservar su conformación tras exposición a altas temperaturas de hasta 90 °C (62, 63).

Son altamente resistentes a presiones elevadas, al agregado de agentes caotrópicos y pHs extremos, tanto alcalinos como ácidos. Existen también, nanoanticuerpos con estabilidad proteolítica frente a enzimas del tracto gastrointestinal, lo que también avalaría su administración oral (64).

Debido a su gran estabilidad, hace posible que se puedan formular en cremas, ungüentos y geles, los cuales pueden ser usados para tratar enfermedades de la piel en forma localizada, evitando así la aparición de efectos adversos en órganos internos. De esta forma, los pacientes con enfermedades inflamatorias de piel pueden beneficiarse de la alta eficacia y especificidad de los anticuerpos (64).

La generación de aplicaciones tópicas de nanoanticuerpos neutralizantes de moléculas involucradas en la inmunopatogenia de enfermedades inflamatorias de piel se muestra como una forma segura y eficaz de tratamiento para los pacientes afectados. Es por ello que los resultados de esta tesis sentarán las bases para futuros desarrollos al respecto (64).

En adición, los nanoanticuerpos son altamente solubles en diferentes soluciones acuosas, debido a la sustitución de residuos hidrofóbicos por residuos hidrofílicos en la región FR2, convirtiéndolos en un fármaco compatible con una gran diversidad de matrices utilizadas en la industria farmacológica. (59)

Otra propiedad importante es la elevada afinidad que presentan por su molécula target, con constantes de disociación (Kd) en el rango nM o incluso pM. Es de importancia recordar que dichas constantes son generalmente alcanzadas con anticuerpos convencionales, en donde la avidéz de unión a antígeno está dada por la presencia de dos sitios de unión, contrastando con el único sitio presente en los nanoanticuerpos (65).

Los nanoanticuerpos presentan además un alto grado de homología (> 80 %) con los dominios VH humanos, siendo una alternativa viable a los problemas de inmunogenicidad que suelen enfrentar los fármacos biológicos convencionales (66).

Finalmente, debido a que son codificados por una sola cadena de ADN, los nanoanticuerpos son fácilmente manipulables genéticamente, presentando una gran versatilidad en la generación de constructos utilizándolos como base. Por ejemplo, son capaces de ser unidos a otros nanoanticuerpos con igual o diferente especificidad, a otros dominios proteicos, o *tags* para su detección y/o purificación (66).

El sistema más utilizado para su expresión es *E. coli*, principalmente por el vasto conocimiento sobre su fisiología y genética, lo cual facilita los trabajos de clonaje y cultivo. Su elevada tasa de crecimiento y rendimiento celular en medios de cultivo poco costosos, unidos a grandes productividades, hacen a este organismo ideal para la producción de este tipo de proteínas. Actualmente, la expresión periplasmática es el método más utilizado para la producción de estos nanoanticuerpos, siendo capaz de generar el entorno oxidante propicio para la formación de enlaces disulfuro, y presentando diversas chaperonas moleculares necesarias para su correcto plegamiento. Además, los nanoanticuerpos no necesitan de modificaciones post-traduccionales para presentar actividad biológica (51, 67).

La producción de nanoanticuerpos utilizando *E. coli* como sistema de expresión permite reducir 10 veces los costos de producción al compararlos con los costos de producción de los anticuerpos convencionales producidos utilizando líneas de mamífero (62).

1.10. Phage Display

1.10.1. Características Generales

Una de las estrategias utilizadas para obtener nanoanticuerpos específicos por una molécula de interés se denomina *Phage Display*. Es una herramienta extremadamente eficaz para seleccionar péptidos o proteínas con propiedades de unión específicas a partir de un gran número de variantes (o biblioteca). Su utilidad radica principalmente en la generación de sondas moleculares contra *targets* específicos, para el análisis y manipulación de interacciones proteína-ligando (68).

En su forma más simple, la técnica consiste en la expresión de péptidos, proteínas o fragmentos de anticuerpos en la superficie de las partículas de bacteriófagos, vinculando físicamente ese “fenotipo” con la secuencia de ADN codificante para dicho nanoanticuerpo (genotipo), que se encontrará dentro de la partícula del fago (68).

La gran ventaja del *Phage Display* respecto a las demás técnicas es la facilidad con la que se pueden seleccionar clones específicos por un blanco particular a partir de bibliotecas de anticuerpos de la forma en que se explicará en las siguientes secciones (68).

1.10.2. Biología de Fagos Filamentosos

Los virus bacteriófagos (fagos, *phages*), cuyos huéspedes son bacterias, son la entidad biológica más abundante en la tierra y han servido de herramientas en diversas áreas de la biotecnología moderna (69).

Dentro del género *Inovirus*, se clasifican a los bacteriófagos filamentosos, un grupo de virus de genoma de ADN circular simple hebra encapsulado en una larga cápside proteica cilíndrica. Muchos de ellos infectan bacterias gram-negativas a través del pili sexual bacteriano (denominados fagos Ff), como los bacteriófagos f1, fd, y M13. Los fagos Ff no matan a su huésped durante el proceso infeccioso (68).

Su cápside cilíndrica y algo flexible, está constituida mayoritariamente por 2700 moléculas de la proteína mayor de la cápside también llamada proteína del gen VIII o pVIII. En un

extremo de la partícula viral se encuentran alrededor de 5 moléculas de la proteína del gen VII (pVII) y 5 más de la proteína del gen IX (pIX). El otro extremo, en cambio, contiene aproximadamente 5 moléculas de la proteína del gen III (pIII) y 5 más de la proteína del gen VI (pVI). Dentro del virión el DNA se orienta de forma que una región horquilla llamada señal de empaquetamiento (PS) queda localizada en el extremo que contiene las proteínas pVII y pIX (70). (Ver Fig. 11.)

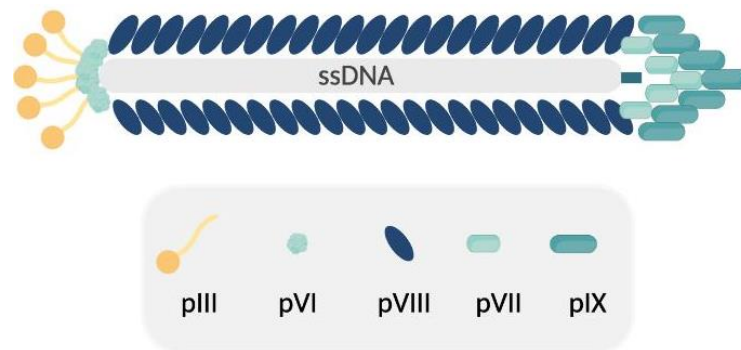


Fig. 11. Representación de la estructura básica de los bacteriófagos filamentosos Ff. El genoma de ADN simple hebra (ADNss) posee la señal de encapsidación con estructura de horquilla (PS) y está envuelto de las proteínas de la cápside. En un extremo, los dímeros de las proteínas pVII y pIX interactúan con PS. El proceso de elongación dispone a muchas unidades de la proteína mayor pVIII en un cilindro. En el otro extremo se localizan las proteínas menores pVI y pIII.

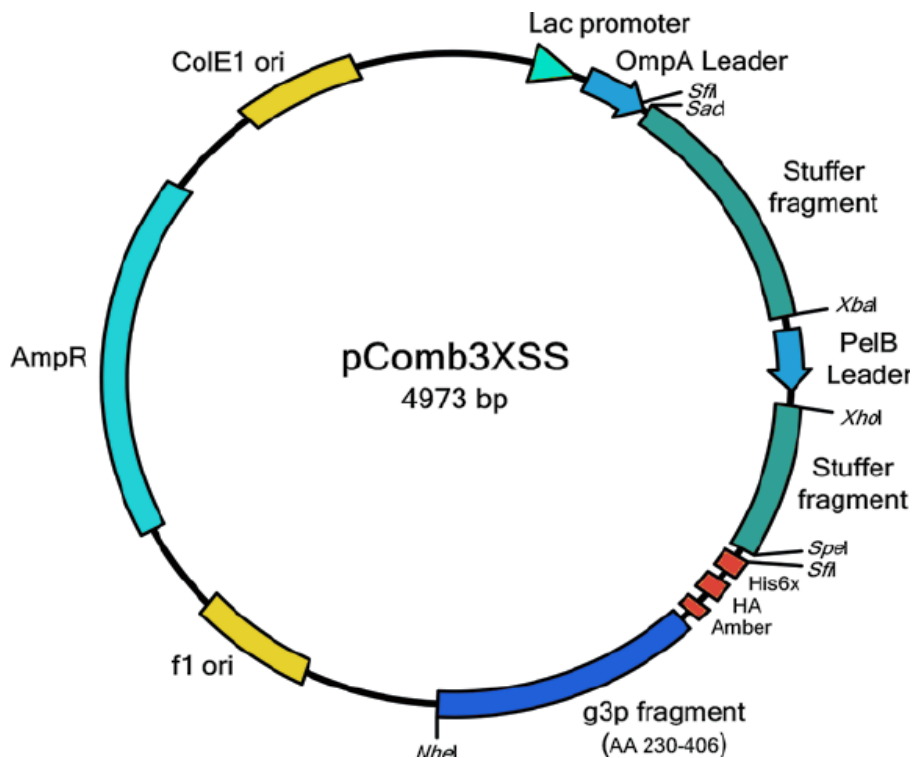


Fig. 12. Representación del plásmido pComb3X, usando para la tecnología de *Phage Display*.

Si bien todas las proteínas de los bacteriófagos filamentosos pueden ser fusionadas a proteínas foráneas, con diferentes grados de éxito, las más utilizadas para ello son la proteína menor pIII y la proteína mayor pVIII. (Ver Fig. 12.)

Para generar bibliotecas de fagos que expresan nanoanticuerpos en la superficie de bacteriófagos, en esta tesis se utilizó un fagémido denominado pComb3X con las siguientes características:

- a) Los vectores fagémidos son plásmidos que codifican para la secuencia de la proteína de la cápside recombinante, y poseen, además, un origen de replicación bacteriano, y un origen de replicación de bacteriófago (IG). También, poseen un gen de resistencia a antibióticos para su selección y, a diferencia de los plásmidos convencionales, pueden ser encapsidados dentro de las partículas virales cuando son propagados en células sobreinfectadas con un bacteriófago *helper*.
- b) Las secuencias de nanoanticuerpos se clonan utilizando la enzima SfiI que permite la expresión del nanoanticuerpo fusionado a la proteína pIII de la cápside.
- c) El promotor Lac inducible por *IPTG* permite la expresión de la fusión recombinante nanoanticuerpo-pIII.
- d) La fusión nanoanticuerpo-pIII se dirige por el péptido líder OmpA (cuya secuencia se ubica en dirección 5' a la secuencia del nanoanticuerpo) al espacio periplásmico de la bacteria donde se pliega adecuadamente.
- e) El tag de seis histidinas (HisTag, H6) presente extremo carboxi del nanoanticuerpo y el decapeptido hemaglutinina (HA-tag) presente en el extremo 3' del tag H6, permiten tanto la purificación como la detección del nanoanticuerpo utilizando anticuerpos anti-HA conjugados.
- f) Contiene un gen de resistencia a Ampicilina para la selección de bacterias que hayan recibido el fagémido por transformación o infección.

Por otro lado, para generar partículas de bacteriófagos con el fagémido en su interior, se utilizó el bacteriófago *helper* M13KO7, que provee proteínas y enzimas necesarias para la replicación viral, que actúan en trans sobre los orígenes de replicación de bacteriófagos presentes tanto en el genoma del fago *helper* como en el vector fagémido. Además, provee las proteínas estructurales para formar nuevos viriones. Típicamente, el fago *helper* usado posee su origen de replicación o su señal de encapsidación defectuosa, lo que permite el encapsulamiento preferencial del vector fagémido sobre el genoma del fago, y un marcador de selección independiente: el gen de resistencia a Kanamicina (71).

1.10.3. Generación de una biblioteca de V_HHs

La generación de éstos nanoanticuerpos (V_HHs) de forma recombinante comienza con la obtención de una biblioteca de ADNc de V_HHs, posteriormente se seleccionan los clones específicos para el antígeno de interés y finalmente se comprueba la especificidad de los V_HHs seleccionados.

La generación de una biblioteca inmune de V_HHs requiere de inmunizaciones con el antígeno de interés, de modo de promover la activación de clones B específicos, su proliferación, y la posterior maduración de la afinidad y cambio de clase de sus inmunoglobulinas.

Seguidamente, se extrae el ARN de las células mononucleares de sangre periférica (PBMC) aisladas, entre las que se encuentran los plasmocitos. Posteriormente, se retrotranscribe el ARNm a ADNc con el objetivo de amplificar mediante PCR las regiones variables (V_HHs) de los anticuerpos totales. Por último, se clonan en el vector fagémido pComb3X, y se electroporan bacterias susceptibles a la infección por fagos. Mediante la adición de fago *helper* al cultivo de bacterias electroporadas se genera la biblioteca de nanoanticuerpos en fagos filamentosos, que se purifica por precipitación selectiva de fagos. En la figura (Ver Fig. 13.) se ejemplifica un proceso más detallado para la obtención de una biblioteca inmune de V_HHs en bacteriófagos filamentosos (68, 72).

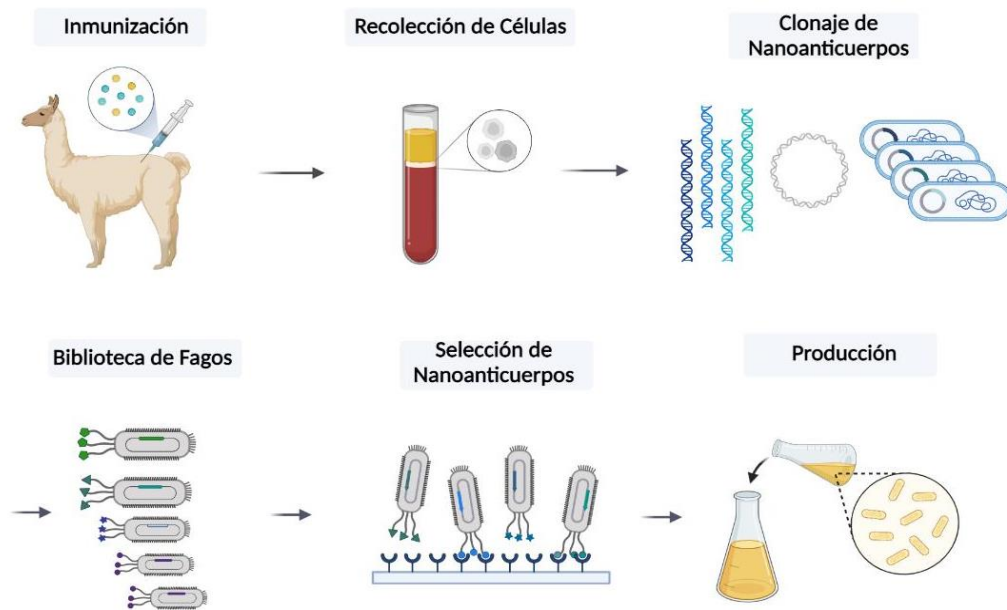


Fig. 13. Proceso de generación de biblioteca inmune de anticuerpos monodominio de camélido en bacteriófagos filamentosos. Inicialmente se inmuniza repetidamente al animal con el antígeno de interés para promover la respuesta inmune adaptativa humoral, usualmente cada 15-21 días, de 4-8 veces. Se realiza la extracción de sangre periférica del animal inmunizado. Se centrifuga en gradiente de densidad con Ficoll. Se aíslan los PBMCs del halo entre la fase sérica y la fase de Ficoll®, entre los que se encuentran los plasmocitos codificantes de HCAbs. Se extrae del ARN de los PBMCs y se retrotranscriben mediante RT-PCR para generar el ADNc. Se amplifican las secuencias codificantes de V_{HH} s con *primers* específicos a partir del ADNc total, para obtener una biblioteca de ADNc de dominios V_{HH} . Se realiza el clonado de las secuencias codificantes de V_{HH} s en un vector fagémido adecuado (pComb3X en el caso de esta tesis). Se transforma una cepa hospedera de *E. coli* con las ligaciones vector: V_{HH} s, y posteriormente se infecta el cultivo de bacterias transformadas con el bacteriófago *helper*, que provee de las proteínas estructurales de la cápside, pero no puede encapsidarse. De esta forma, los fagos emergentes serán solamente los recombinantes, que luego se precipitan y constituyen la biblioteca de nanoanticuerpos en bacteriófagos filamentosos.

1.10.4. Selección de nanoanticuerpos

Una vez obtenida la biblioteca de nanoanticuerpos en fagos, se procede a la selección de clones específicos para la molécula de interés. Las rondas de selección o “*panning*” consisten en 4 pasos elementales (Ver Fig. 14). El primero es la unión de la biblioteca (*input*) al antígeno inmovilizado en un soporte como puede ser una placa de *ELISA*. Seguidamente se realiza un paso de lavado con agentes caotrópicos, con el fin de eliminar los fagos que no se unen al antígeno. Los clones unidos se eluyen (*output*) utilizando distintos agentes disociantes como ácidos, moléculas competidoras, o proteasas. Finalmente se amplifica la población de fagos eluida (*output* amplificado) para realizar rondas sucesivas de *panning*.

La amplificación consiste en la infección de bacterias susceptibles con el *output* del *panning* y la reinfección con el bacteriófago *helper* que provee los componentes virales que no posee el vector fagémido, para replicar el ADN, formar la cápside y dar origen a nuevas partículas virales. El cultivo bacteriano coinfectado se selecciona doblemente por resistencias a antibióticos. Los fagos amplificados se purifican del sobrenadante de cultivo por precipitación con PEG, pudiendo officiar de *input* en una ronda siguiente, lo que conlleva al enriquecimiento de fagos específicos. Cuando se crea oportuno, en base al título observado en los *outputs*, se analizan los fagos mediante la inducción de la expresión de los nanoanticuerpos en cultivo bacteriano y el análisis de los sobrenadantes por *ELISA* para evaluar presencia de clones positivos y corroborar su especificidad (*screening*) (72)

A continuación, se resumen las definiciones de algunos conceptos de “*phage display*” que se utilizarán frecuentemente en este trabajo, para una comprensión más fluida de los siguientes apartados y resultados:

-“*Panning*”: conjunto de técnicas llevadas a cabo para seleccionar clones específicos por un antígeno. Normalmente es necesario realizar sucesivas rondas de selección, o “rondas de *panning*” para poder aislar eficientemente dichos clones.

-“*Ronda de panning*”: consta de la incubación de una población de fagos con el antígeno de interés adsorbido en una placa de *ELISA*, permitiendo la unión de fagos con V_HHs específicos, y la eliminación de aquellos inespecíficos tras sucesivos lavados. Incluye la posterior separación física de los fagos y el antígeno (elución).

-“*Input*”: población de fagos que se pone a incubar con el antígeno en una ronda de *panning*.

-“*Output*”: población de fagos que se retuvo en los pocillos adsorbidos con el antígeno, y que fue posteriormente eluida.

-“*Screening*”: testeo de la reactividad y especificidad de clones individuales de V_HHs seleccionados contra el antígeno de interés durante el *panning*. Estos V_HHs son producidos como proteína recombinante libre, prescindiendo de la partícula viral. En este trabajo se realizará utilizando un ensayo de *ELISA*.

-“Amplificación de un *output*”: multiplicación de las partículas virales obtenidas tras una ronda de *panning* (u *output*), mediante infección de bacterias por dicho *output* y posterior reinfección con fago *helper*.

Así, en el proceso de selección, el *output* amplificado de una ronda de *panning*, se utiliza como *input* de la siguiente ronda de *panning*, con el fin lograr un aumento en la proporción de fagos específicos por el antígeno (“enriquecimiento”) a lo largo del proceso de *panning*.

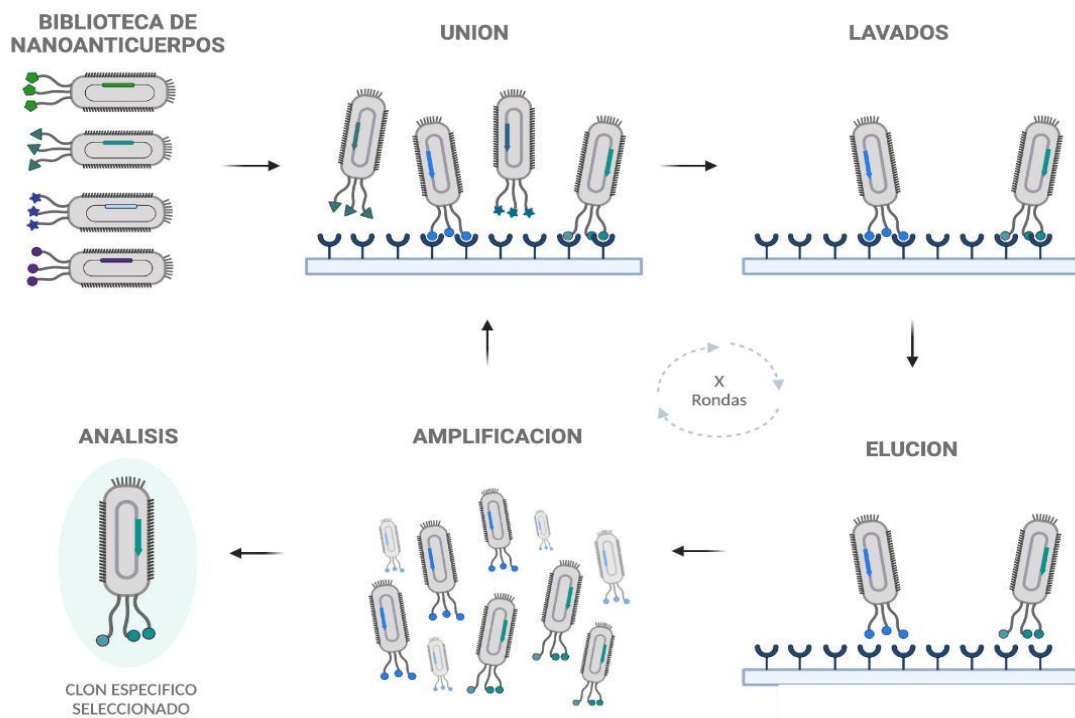


Fig. 14. Esquema del proceso de *panning*. En el paso 1 se ofrece una biblioteca de nanoanticuerpos en fagos filamentosos (Ej.: M13KO7) a pocillos de *ELISA* sensibilizados con el antígeno de interés. Los fagos se unen al soporte inmovilizado con distintas afinidades. En el paso 2, se lavan los fagos inespecíficos o de baja afinidad por el antígeno, conservando los fagos específicos. En el paso 3 se eluyen los fagos que reconocen el antígeno para amplificarse mediante reinfección de la bacteria huésped con el fagémido y el fago *helper*, en el paso 4. Finalmente, según sea el caso, se reinicia el ciclo de *panning* (de 3 a 4 rondas) o se analizan los clones para evaluar su especificidad.

Una ventaja de la metodología de *phage display* es que permite la selección basada en la afinidad de unión al antígeno o molécula *target*. Disminuyendo la concentración de antígeno en el *coating*, se puede exigir mayores afinidades en los nanoanticuerpos seleccionados, debido a la competencia por el sitio de unión al antígeno. Esta estrategia será tenida en

cuenta en este trabajo de tesis. También se pueden elegir V_HHs con especificidades por epítopes concretos determinados, si se eluye con un competidor apropiado, lo que es útil, por ejemplo, a la hora de seleccionar nanoanticuerpos que inhiban la interacción de un receptor con su ligando. Incluso pueden seleccionarse nanoanticuerpos que se unan a su antígeno con mayor afinidad a distintas temperaturas y/o pHs variando las condiciones de elución. Estas y otras particularidades hacen al *phage display* una técnica muy versátil (72).

2. Objetivos

2.1. Objetivo general

Generación, expresión, y evaluación de la actividad biológica de diversos nanoanticuerpos contra citoquinas proinflamatorias para su potencial uso terapéutico en la inmunopatogenia de enfermedades inflamatorias de la piel.

2.2. Objetivos específicos

- 2.2.1. Optimizar la expresión, adecuando las condiciones de crecimiento, inducción y purificación, de nanoanticuerpos α -hTL1A seleccionados en sistemas procariotas.
- 2.2.2. Evaluar el reconocimiento de los nanoanticuerpos contra su target hTL1A (humano) de forma *in-vitro* utilizando técnicas de *ELISA*.
- 2.2.3. Evaluar la inhibición de la unión de hTL1A con su receptor hDR3 *in-vitro* en *ELISA*, por parte de los diferentes nanoanticuerpos producidos.
- 2.2.4. Analizar el reconocimiento cruzado de los nanoanticuerpos contra mTL1A, su homólogo murino, *in-vitro* mediante la técnica de *ELISA*, a modo de facilitar su traslado a modelos animales, en etapas posteriores de desarrollo.
- 2.2.5. Desarrollar transformantes transitorias de HEK-293 expresando hTL1A para evaluar tanto la unión de los nanoanticuerpos, como la inhibición de la unión TL1A/DR3, mediante citometría de flujo.
- 2.2.6. Generar un banco de células de las siguientes líneas: TF-1, U87-MG y DH82, que se utilizarán a futuro para analizar la actividad biológica de diversos nanoanticuerpos *in vitro*.
- 2.2.7. Generación de nanoanticuerpos anti-IL-4, IL-13 e IL-31, a partir de biblioteca inmune contra dichas proteínas.

3. Metodología

3.1. Materiales

3.1.1. Material biológico

Las cepas bacterianas de *Escherichia coli* BL21 Gold, Rosetta-gami, Lemo21 (DE3) y Tuner utilizadas en este proyecto provinieron del cepario del laboratorio de Biotecnología de la Universidad ORT Uruguay, así como también las células eucariotas HEK-293.

Las células electrocompetentes TG-1 se obtuvieron de Lucigen (60502-1) y las líneas celulares empleadas se obtuvieron de ATCC: TF-1 (CRL-2003TM), DH82 (CRL-10389TM) y U-87 MG (HTB-14TM).

3.1.2. Vectores plasmídicos

Los vectores utilizados a lo largo del trabajo fueron:

pET-28a: Vector utilizado para obtener alta expresión proteica en bacterias, contiene un gen de resistencia a Kanamicina (Sigma-Aldrich®, #60615) para su selección. Posee un peso molecular de 5369 pb. Contiene un *tag* de purificación por cola de histidinas 6xHis.

pComb3X: Vector fagémido diseñado para expresar fragmentos de anticuerpos y otras proteínas en la superficie de fagos filamentosos. Contiene un gen de resistencia a Ampicilina. Posee un peso molecular de 3000 pb. Contiene un *tag* de purificación de hemaglutinina (HA).

pUC19: Vector para calcular eficiencia de bacterias electrocompetentes, contiene un gen de resistencia a Ampicilina para su selección. Posee un peso molecular de 2686 pb.

pCDNA3.1: Vector utilizado para la expresión constitutiva de proteínas en líneas celulares de mamíferos, bajo el *enhancer* y promotor del Citomegalovirus (CMV). Se empleó para transfectar células eucariotas y analizar los resultados mediante citometría de flujo. Posee un peso molecular de 5428 pb.

pCDNA3.1_GFP: Igual al plásmido presentado anteriormente, modificado para la expresión constitutiva de la proteína reportera *GFP* (por sus siglas en inglés: *Green fluorescent protein*) y utilizado como control positivo de transfección.

3.1.3. Nanoanticuerpos

Las secuencias de los nanoanticuerpos anti-hTL1A utilizados en este proyecto fueron adquiridas gracias a Lucía Vanrell en investigaciones previas a la realización de esta tesis, fueron sintetizadas en el vector pET-28a por la empresa GenScript. Las secuencias no se muestran por conflictos de confidencialidad.

3.1.4. Anticuerpos

Los anticuerpos utilizados a lo largo de la tesis fueron:

anti-HA: Biolegend (#901519)

anti-IgG: Invitrogen (#A18903)

anti-TL1A: R&D Systems (#MAB74422)

anti- Human TL1A/TNFSF15: Alexa Fluor® 647-conjugated

anti-HA: Rabbit PE (policlonal)

3.1.5. Citoquinas

Todas las citoquinas (TL1A e interleuquinas) utilizadas en los experimentos realizados fueron obtenidas comercialmente de las empresas Sino Biological y/o R&D Systems o generadas “*in-house*” en sistemas de expresión procariotas. La versión de mTL1A generada en baculovirus, fue cedida por el Centro de Investigación Médica Aplicada (CIMA), España.

3.1.6. Soluciones

Las siguientes soluciones fueron filtradas con filtros Millex-GV de 0.22 μm , empleando el flujo laminar.

Ampicilina 100 mg/mL: 1 g de Ampicilina en 10 mL de agua mQ[®].

Kanamicina 50 mg/mL: 0,5 g de Kanamicina en 10 mL de agua mQ[®]. (Sigma-Aldrich[®], #60615)

Cloranfenicol 34 mg/mL: 0,34 g de Cloranfenicol en 10 mL de etanol 95%.

IPTG 1 M: 2.389 g de IPTG en 10 mL de agua mQ[®].

Ramnosa 1M: 1,64 g de ramnosa en 10 mL de agua destilada.

Glucosa 1M: 9 g de glucosa en 50 mL de agua destilada.

Las siguientes soluciones fueron autoclavadas durante 20 minutos a 121°C.

Glicerol 10%: 100 mL de glicerol en 1 L de agua mQ[®].

Glicerol 50%: 25 mL de glicerol en 25 mL de agua mQ[®].

Medio SOB: 20 g/L Triptona, 5 g/L Extracto de levadura, 0,5 g/L Cloruro de sodio, 2,5 mM Cloruro de potasio, 10 mM Cloruro de magnesio y 10 mM Sulfato de magnesio.

Medio SOC: Medio SOB suplementado con 20 mM de glucosa a partir de la solución de glucosa 1M. (Este medio no es autoclavado).

Medio LB: 10 g/L triptona, 5 g/L extracto de levadura y 10 g/L cloruro de sodio.

Medio LB agar: medio *LB* suplementado con 15 g/L de agar bacteriológico.

Medio SB: 30 g/L de triptona, 20 g/L de extracto de levadura, 10 g/L de MOPS.

Solución PEG-NaCl: 100g de polietilenglicol (PEG-8000, Sigma-Aldrich[®], #154660) y 73,05 g de NaCl en 500 mL de agua destilada.

Las siguientes soluciones no necesitaron esterilidad, por lo tanto, no fueron filtradas ni autoclavadas.

PBS 10X: KH_2PO_4 18 mM, Na_2HPO_4 100 mM, NaCl 1,37 M y KCl 27 mM, pH 7,4.

Buffer Acetato de Sodio 3M: 246,1 g/L de acetato de sodio, pH=5.2.

Tris Acetato EDTA (TAE) 50X: Tris base-HCl 2 M, CH_3COOH 1 M, EDTA 50 mM, pH 8,0.

Tris-Glicina 10X: Tris base 0,25 M, glicina 1,92 M y SDS 1 %, pH 8,4.

Buffer A (IMAC): NaH₂PO₄ 50 mM, NaCl 300 mM, imidazol 20 mM, pH 8.

Buffer B (IMAC): NaH₂PO₄ 50 mM, NaCl 300 mM, imidazol 500 mM, pH 8.

Buffer Tris-salino (TBS) 10x: 60,6 g/L Tris y 87,6 g/L NaCl en agua mQ[®], pH 7,6.

Buffer de carga reductor 6X: Tris base- HCl 300 mM pH 6,8, SDS 12 %, glicerol 30 %, azul de bromofenol 0,6 % y ditiotreititol 600 mM.

Buffer de diálisis de hTL1A: Tris-Base 10 mM, NaCl 100 mM y β-mercapto 1 mM en 1 L de agua destilada.

Buffer de Transferencia Tris-Glicina: 25 mM Tris Base, 190 mM Glicina, 20% v/v metanol, en H₂O destilada.

PMSF 1 M: 0.174 g de PMSF en 10 mL de isopropanol.

Urea 8 M: 7.2 g de urea en 15 mL de agua destilada.

EDTA 0.5M: 9.305 g en 50 mL de agua mQ[®], pH 8.

Colorante Azul de Coomassie: 0.25 g de Coomassie R250 en 100 mL de metanol: agua destilada: ácido acético en relación volumétrica 5:4:1.

Solución decolorante de Coomassie: Solución con una relación volumétrica metanol: agua destilada: ácido acético de 3:6:1.

Poliacrilamida 30%: 29 g de acrilamida y 1 g de bisacrilamida en 100 mL de agua destilada.

SDS 10%: 5 g de dodecil sulfato sódico en 50 mL de agua destilada.

APS 10%: 5 g de persulfato de amonio en 50 mL de agua destilada.

BSA 1%: 1 g de BSA en 100 mL de PBS 1X.

PBS-Tween[®] 20 0.05%: 250 μL de Tween[®] 20 en 500 mL de PBS 1X.

TMB 6 mg/mL: 60 mg de TMB en 10 mL de DMSO.

H₂O₂ 3%: 1 mL de H₂O₂ 30 volúmenes en 9 mL de agua mQ[®].

H₂SO₄ 2N: 23.5 mL de H₂SO₄ 17 M en 200 mL de agua destilada.

Sustrato HRP: 12.5 mL de buffer acetato de sodio 0.1 M, 200 μL TMB y 50 μL H₂O₂ 1%.

3.2. Métodos

3.2.1. Procedimientos generales

3.2.1.1. Generación de células electrocompetentes

Se largaron dos precultivos con 5 mL de medio *LB* inoculados con 10 µL del stock de la cepa bacteriana a utilizar. Se incubó 16 hrs a 37 °C y 250 rpm. Se inoculó con los 5 mL de precultivo, dos matraces de 1 L con 250 mL de *LB*. Los mismos se incubaron en las mismas condiciones que los precultivos, hasta alcanzar una OD_{600nm} de 0.4. se transfirieron los matraces a un baño de hielo por 15-30 minutos y se agitaron cada 5 min.

Pasado el tiempo, se transfirió el cultivo a tubos *Falcon*® de 50 mL y se centrifugó a 1000 xg por 15 min a 4 °C. se descartó el sobrenadante y se resuspendió el *pellet* en 50 mL de agua mQ® fría autoclavada.

Luego se volvió a centrifugar en las condiciones anteriores, se descartó el sobrenadante y se resuspendió el *pellet* en 50 mL de mQ® autoclavada juntando de a dos tubos *Falcon*®. Se repitió la centrifugación en las mismas condiciones anteriores, se descartó el sobrenadante y se resuspendió en 10 mL de glicerol 10%.

Se repitió la centrifugación por 20 minutos, se descartó el sobrenadante, evitando arrastrar el *pellet* y se resuspendió en 250 µL de glicerol 10%. Finalmente, se alicuotó de a 40 µL en tubos *Eppendorf*® de 0,5 mL y se almacenaron a -80 °C.

3.2.1.2. Transformación de bacterias por electroporación

Para llevar a cabo la electroporación de un plásmido dentro de células electrocompetentes, se trabajó en un ambiente estéril utilizando mecheros *bunsen* y se colocó las células, cubetas de electroporación de 0,1cm (Sigma-Aldrich® #Z706078-50EA), medio de recuperación SOC y el material genético en hielo. Se partió incubando 1 µL del ADN deseado en 40 de células electrocompetentes en hielo.

Pasado el tiempo, se colocó los 41 μL en la cubeta de electroporación y se realizaron pequeños golpes sobre la mesada para evitar formación de burbujas. Luego se secó la condensación exterior de la cuba con papel absorbente y se colocó en el electroporador (Bio-Rad MicroPulser 165-210), se realizó el pulso eléctrico.

Rápidamente se colocó 1 mL de medio de recuperación SOC y se dejó incubando a 37 °C por 40-60 minutos. Luego de la recuperación, las bacterias transformadas se cultivaron en placas de Petri con medio *LB* sólido suplementado con el antibiótico correspondiente al marcador de selección presente en el plásmido particular.

Se realizaron las diluciones necesarias según la eficiencia de transformación estipulada. Cada vez que se electroporó, se realizó un control de viabilidad y un control negativo de transformación creciendo bacterias electroporadas sin ADN en placa de medio *LB* sin antibiótico, y medio *LB* con antibiótico, respectivamente. Las placas sembradas fueron crecidas 16 h en estufa a 37 °C.

3.2.1.3. Electroforesis de proteínas en gel *SDS-PAGE*

A la hora de realizar una electroforesis *SDS-PAGE*, se elaboró el gel según el porcentaje de acrilamida necesario, en este caso 15%. De esta manera se mezclaron los componentes de la siguiente tabla en el orden dado y se colocó en el soporte de geles de poliacrilamida, finalmente se agregó una pequeña capa de isopropanol. (Ver Tabla. 2.)

Tabla. 2. Reactivos y cantidades empleadas para el armado de un gel *running* de poliacrilamida.

<i>Running Gel</i>	
H2O destilada	2.3 mL
Acrilamida 30%	5 mL
Buffer 1,5 M Tris pH 8.8	2,5 mL
<i>SDS</i> 10%	0.100 mL
<i>APS</i> 10%	0.100 mL
<i>Temed</i>	0.004 mL

Una vez polimerizado el gel *running*, se retira el isopropanol, y se elabora la mezcla del gel *stacking*, se colocó en el soporte de geles y se agregó el peine con el número de pocillos necesario. (Ver Tabla. 3.)

Tabla. 3. Reactivos y cantidades empleadas para el armado de un gel *stacking* de poliacrilamida.

<i>Stacking Gel</i>	
H2O destilada	3.4 mL
Acrilamida 30%	0.85 mL
Buffer 1,0 M Tris pH 6.8	0.625 mL
<i>SDS</i> 10%	0.050 mL
<i>APS</i> 10%	0.050 mL
<i>Temed</i>	0.005 mL

Luego de polimerizado el gel, se colocó en la cuba, se agregó buffer de corrida Tris-Glicina, se cargó en cada pocillo la cantidad necesaria, así como también se cargó 5 μ L de marcador de peso molecular (*PageRulerTM Prestained Protein Ladder*, 10 a 180 kDa (Thermo ScientificTM, #26616)), se colocó la tapa, se conectaron los electrodos y se corrió a entre 100-140 V, hasta que las muestras llegaran al final del gel.

3.2.1.4. Precultivos

Para generar un precultivo de bacterias, se partió de un stock criopreservado de bacterias o una alícuota de células electrocompetentes según fuese el caso y se inoculó un tubo de precultivo con 5 mL del medio de cultivo correspondiente (*LB* o *SB*). Luego se incubó a 37 °C y 250 rpm por 16 h.

3.2.1.5. Stock de glicerol

Para llevar a cabo un stock de glicerol de cualquier cepa bacteriana, se partió de un precultivo (Ver metodologías sección 3.2.1.4) y se colocó en un criotubo, 750 μ L de precultivo y 750 μ L de glicerol 50% estéril. Se resuspendió suavemente trabajando en esterilidad y finalmente se almacenó a -80 °C.

3.2.1.6. Electroforesis de ácidos nucleicos

Al llevar a cabo una electroforesis de ácidos nucleicos, se elaboró un gel de agarosa 1% en buffer *TAE* 0.5 X y se suplementó con el agente intercalante *GoodViewTM* (SBS Genetech Co. Ltd., #HGV-2). Una vez preparado el gel, se armó la cuba de electroforesis y se colocó la mezcla en el molde.

Luego se cargó 5 µL del marcador de peso molecular *GeneRuler DNA Ladder Mix* (Thermo ScientificTM, #SM0331) en un pocillo y las muestras junto con buffer de carga *Gel Loading Dye Purple* (6X) (NEB®, #B7024S) en el resto de los pocillos.

Finalmente se preparó buffer *TAE* 0,5 X y las muestras se corrieron en la cuba electroforética *Bioer Mini Run* (GE-100) a 100 V. El tiempo de corrida se determinó de acuerdo al tamaño de las muestras. La visualización del gel se realizó utilizando el equipo (Transiluminador UV 312 #ZFD015) y el registro fotográfico utilizando *E-GelTM Imager System* (Thermo ScientificTM, #4466611).

3.2.1.7. Cuantificación de ácidos nucleicos

A la hora de cuantificar la concentración de ácidos nucleicos de una muestra, se utilizó el lector de microplaca *Infinite[®] M200 PRO NanoQuant* (Tecan), la placa *NanoQuant Plate* y el software *i-control*, y se midió la absorbancia a 260 nm.

3.2.1.8. Precipitación de ácidos nucleicos

La precipitación se realizó agregando 1/10 partes de acetato de sodio 3 M pH=5.2 y se mezcló mediante pipeteo. Luego se agregaron dos partes de EtOH absoluto y se mezcló nuevamente. Finalmente se incubó 16 hrs a -80 °C

Al día siguiente se centrifugó 15-30 minutos a 12000 xg y 4 °C, luego se descartó el sobrenadante y se agregó 1 mL de EtOH 70 °C. Se mezcló invirtiendo el tubo *Eppendorf[®]* 6 veces sin pipetear. Se repitió el procedimiento anterior dos veces más, se descartó el sobrenadante y se dejó secando el *pellet* en cabina de flujo laminar. Una

vez se evaporó el alcohol, se resuspendió en 30 μL de H_2O ultrapura y se cuantificó la concentración.

3.2.1.9. Técnica de ELISA

Primero se sensibilizaron (*coating*) la cantidad de pocillos necesarios de una placa de ELISA (*Greiner Bio-One 96-Well High Binding Standard ELISA Microplates (Fisher ScientificTM, #07-000-102)*) con 100 μL en cada pocillo de la proteína en cuestión a la concentración necesaria en PBS-1X. Luego se incubó 16-24 hrs a 4 °C en cámara húmeda.

Al otro día se descartó el *coating* y se bloquearon los pocillos, con 300 μL de solución de bloqueo por pocillo (*PBS-1X-BSA 1% (BSA, Sigma-Aldrich®, #A2153)*) y se incubó por 1 hr a 37 °C. Pasado el tiempo de incubación, se descartó la solución y se lavó 5 veces con 300 μL por pocillo de *PBS-1X - 0,05% Tween® 20*.

Luego se incubó por 1 h en agitación a 250 rpm con 100 μL de la proteína en cuestión (nanoanticuerpo purificado, sobrenadante 16-24 hrs inducido de pComb3X o sobrenadante sonificado de pET-28a inducido) a una concentración determinada.

Se utilizó también en todos los ensayos un nanoanticuerpo control a 1 $\mu\text{g}/\text{mL}$, con especificidad despreciable para las proteínas involucradas en esta tesis (B3.4). El mismo surge del desarrollo de Agustina Olivera y Camila Chiesa en su tesis de grado (73).

Pasado el tiempo de incubación, se lavó 8 veces con 300 μL por pocillo de *PBS-1X-0,05% Tween® 20* y luego se incubó con 100 μL por pocillo del anticuerpo secundario (α -HA-HRP o Estreptavidina-HRP según el experimento), por 1 hr con agitación de 250 rpm.

Luego de transcurrido el tiempo de incubación, se descartó el anticuerpo secundario y se lavó 8 veces con 300 μL por pocillo de *PBS-1X - 0,05% Tween® 20*. Finalmente se incubó por 7 minutos con 100 μL de solución de revelado, sustrato HRP (12.5 mL de

buffer acetato de sodio 0.1 M, 200 μ L TMB y 50 μ L H₂O₂ 1%), se ocultó de la luz con papel de aluminio y se colocó en agitación de 250 rpm.

Finalmente se cortó la reacción adicionando 50 μ L por pocillo de H₂SO₄ 2N y se midió la absorbancia 450 nm en el equipo *MultiskanTM FC Microplate Photometer*. (Ver Tabla. 4.)

Tabla. 4. Condiciones de los diferentes tipos ELISAs realizados*.

Tipo	Coating	Incubación	Revelado Primario	Revelado Secundario
<i>Screening</i>	Citoquina	Nanoanticuerpo	Anti-HA	-
Unión L-R [↔]	Citoquina	-	Receptor-Fc	Anti-Fc HRP
Unión L-R	Citoquina	-	Receptor-Biotina	Estreptavidina-HRP
Inhibición	Citoquina	Nanoanticuerpo	Receptor-Fc	Anti-Fc HRP
Inhibición	Citoquina	Nanoanticuerpo	Receptor-Biotina	Estreptavidina-HRP
Cuantificación	Citoquina	Nanoanticuerpo	Anti-HA	-

* En todos los casos se utilizó una solución de bloqueo de PBS-BSA 1%. Para el *screening* de IL-13 murina se utilizó gelatina 1%.

↔L-R: ligando-receptor

3.2.1.10. Proceso de *Panning*

Se realizaron en este trabajo diversos *pannings* contra varias moléculas *target* (Ver Tabla. 5.), sin embargo, el proceso global es compartido en todas de ellas. En este apartado se mencionan los pasos generales llevados a cabo y se harán aclaraciones pertinentes en caso de diferencias particulares a cada molécula.

Se partió sensibilizando dos pocillos de una placa (Greiner Bio-One 96-Well *High Binding Standard ELISA Microplates* (Fisher ScientificTM, #07-000-102)) con 100 μ L por pocillo de proteína *target* a 10 μ g/mL en PBS-1X y se incubó 16-24 hrs a 4 °C en cámara húmeda.

Luego de 16-24 hrs se incubó con 300 μ L por pocillo de solución de bloqueo PBS 1X-BSA 3% (BSA, Sigma-Aldrich[®], #A2153), por 1 hr a 37 °C. Se descartó y se lavó 5 veces con 300 μ L de PBS-1X- 0,05% Tween[®] 20 por pocillo. Posteriormente, se incubó con 100 μ L de la biblioteca u *output* anterior por 1 hr a 250 rpm. Seguido de ello, se

procedió a realizar lavados (cantidad variable) con 300 μ L de PBS-1X - 0,05% Tween[®] 20.

Luego de los lavados, se incubó por 30 minutos a 37 °C y 250 rpm con 100 μ L por pocillo de Tripsina Pancreática Bovina (Sigma #T9935) 10 mg/mL en TBS. Pasados dichos minutos, se juntó el contenido de los pocillos en un tubo Eppendorf[®] y se agregó inhibidor de tripsina (100 mg/mL).

De esta manera se obtuvo el *output* de la primera ronda de selección de nanoanticuerpos. Se continuó este proceso cuatro veces, incubando como *input*, el *output* saliente y amplificado de cada ronda anterior.

Tabla. 5. Condiciones de los diferentes tipos *pannings* realizados.

Molécula	Coating	Preabsorción	Rondas	Lavados
hTL1A-HEK	10 μ g/mL	Si/No	2	1 Ronda Permisivos ¹ 2 Ronda Estrictos ²
mTL1A Baculovirus	10 μ g/mL	No	3	1 Ronda Permisivos 2 Ronda Estrictos
IL-4h <i>E.coli</i>	10 a 50 μ g/mL	No	4	Permisivos
IL-4h HEK	10 μ g/mL	No	5	1 Ronda Permisivos Sigüientes Estrictos
IL-31c HisTag	10 μ g/mL	No	4	3 Rondas Permisivas Restante Estricta
IL-13m	10 μ g/mL	No	4	Permisivos / Estrictos

¹ Lavados Permisivos: 10 tandas de lavados comunes.

² Lavados Estrictos: 5 tandas de 10 lavados con 5 min de agitación después de cada lavado.

3.2.1.11. Amplificación de outputs

A la hora de amplificar los *outputs* de las rondas de *panning*, se agregó 30 μ L de bacterias TG-1 electrocompetentes en 5 mL de medio SB y se incubó por 2 hrs hasta alcanzar una OD_{600nm} de 0.8-1 nm. Una vez se alcanzó la OD necesaria, se pasó 2 mL de estas a un tubo de precultivo y se incubó con 150 μ L de *output* por 30 minutos a 37 °C y 250 rpm. Posteriormente, el cultivo se llevó a 24 mL de medio SB con Ampicilina a 33 μ g/mL en un matraz de 100 mL y se incubó por 1 hr a 37 °C y 250 rpm.

Pasado el tiempo, se adicionó Ampicilina a 66 µg/mL y se incubó por otra hora en las mismas condiciones. Posteriormente, se infectó con 50 µL de fago *helper* M13KO7 (NEB[®], #N0315S 1012 pfu/mL) y se incubó por 2 hrs en las mismas condiciones. Pasadas las 2 hrs, se adicionó Kanamicina (Sigma-Aldrich[®], #60615) a 70 µg/mL y se incubó 16-24 hrs en las mismas condiciones.

Al día siguiente se colocó el cultivo en un tubo *Falcon*[®] y se centrifugó durante 20 min, a 4°C y 3000 xg, pasado el tiempo, se cambió el cultivo a otro *Falcon*[®] y se volvió a centrifugar en las mismas condiciones. Luego se pasó el cultivo a un tubo *Nalgene*, se agregó 1/3 de volumen de PEG-NaCl (PEG-8000, Sigma-Aldrich[®], #154660) y se incubó por 1 hr en hielo a 4 °C. Pasado el tiempo, se centrifugó a 14000 xg, 4 °C y 30 minutos.

Finalmente se descartó el sobrenadante y se resuspendió en 2 mL de PBS-1X-BSA 3% (BSA, Sigma-Aldrich[®], #A2153) y se agregó 300 µL de inhibidor de proteasas (*cOmpleteTM Protease Inhibitor Cocktail 7X* Roche, #11836170001). Una vez pronto, se utilizó en la siguiente ronda o se almacenó a -80 °C.

3.2.1.12. Titulación de outputs

Para realizar la cuantificación, se inoculó un tubo de precultivo con 30 µL de bacterias TG-1 en 5 mL de medio *SB* y se incubó a 37 °C y 250 rpm por 2 hrs aproximadamente hasta llegar a una *OD*_{600nm} 0.6-0.8 nm. Una vez se alcanzó la *OD*, se alicuotó 100 µL de TG-1 en 4 tubos *Eppendorf*[®].

Luego se prepararon las diluciones del *output* correspondientes colocando medio *SB* en tubos *Eppendorf*[®], se realizaron diluciones seriadas en base 10 según correspondía en base a títulos esperables en cada caso. Adicionalmente se realizó una alícuota de control negativo, teniendo únicamente medio *SB* y bacterias TG-1.

Una vez terminadas las diluciones, se inoculó las alícuotas de células con 10 µL de cada dilución y se incubó a 37 °C, 250 rpm por 30 minutos. Pasado el tiempo de incubación se plaqueó en placas *LB* agar con Ampicilina y se incubó en la estufa a 37 °C, 16-24 hrs.

Al día siguiente se calculó el título del output utilizando la siguiente ecuación:

$$\text{Título del output} = n^{\circ} \text{ de colonias} \times 100 \text{ (factor de conversión)} \times n^{\circ} \text{ de dilución}$$

3.2.1.13. Clonaje en vector pET-28a

La clonación en vector pET-28a puede llevarse a cabo partiendo de un *output* o una colonia. En ambos casos se realizan los mismos pasos, con excepción de la clonación por *output* que requiere una infección inicial de células TG-1 y sin amplificar por PCR, mientras que la clonación por colonias si requiere de una PCR inicial.

3.2.1.13.1. Clonaje de *output* en vector pET-28a

Para poder clonar un *output* al plásmido pET-28a, se comenzó infectando 0.5 mL de células *E. coli* / TG-1 a una $OD_{600\text{ nm}}$ de 0.8-1 UA con 100 μL de *output* obtenido a partir de la última ronda de *panning* realizada. Se incubó durante 30 minutos a 37 °C, y se procedió a agregar a la mezcla 3.5 mL de SB-ampicilina (100 $\mu\text{g}/\text{mL}$) dejándose en agitación 16-24 hrs.

Al día siguiente, se centrifugó el cultivo a máxima velocidad (14000 xg) por 10 minutos. Con el *pellet* recolectado se procedió a realizar una *miniprep* según el protocolo de NZYtech (#MB01001), obteniendo los plásmidos pComb3X de todos los clones seleccionados.

Luego de cuantificar ADN plasmídico por la técnica de *Nanodrop* (Ver metodologías sección 3.2.1.7), se procedió a digerir 20 μg de la preparación con 40 U de enzima de restricción *Sfi*I (#R0123S NEB) a 50 °C durante toda la noche. De forma paralela, se digirió el vector pET-28a en las mismas condiciones (20 μg de vector, con 40 U de enzima). Los productos de cada digestión fueron corridos en un gel de agarosa 1% y teñidos con GoodViewTM (SBS Genetech Co. Ltd., #HGV-2) (Ver metodologías sección 3.2.1.6). Las bandas correspondientes fueron recuperadas mediante un kit comercial de extracción de ácidos nucleicos a partir de geles de agarosa (#MB01101 NZYGelPure, Nzytech).

Seguidamente, se ligaron los clones digeridos (200 ng/ ligación) con el vector pET-28a (1 μg / ligación) en una relación molar 3:1 (inserto:vector) durante 1 hora a 22°C

utilizando 1.25 U/ ligación de la enzima T4 DNA Ligasa (#M0202S, NEB) en un volumen final de 10 μ L/ ligación. La enzima fue inactivada incubando la mezcla durante 10 minutos a 65°C.

Posteriormente, se transformaron células competentes *E. coli Lemo21*(DE3) mediante la electroporación de 1 μ L tal y (Ver metodologías sección 3.2.1.2). Las bacterias se incubaron 1 hora a 37 °C con agitación en 1 mL de SOC, y posteriormente se sembraron diluciones en placas de LB agar suplementado con antibiótico (Kanamicina 50 μ g/mL y Cloranfenicol 34 μ g/mL). Las placas se dejaron a 37°C 16-24 hrs.

3.2.1.13.2. Clonaje de secuencias en vector pET-28a

Para la clonación de secuencias, se partió de *minipreps* de los clones positivos en el plásmido pComb3X siguiendo el protocolo del kit NZYtech (#MB01001). Se amplificó mediante una PCR utilizando un *mix* global (Ver Tabla. 6.) y luego *primers* específicos según el tipo de V_HH 1 o V_HH 2 (Ver Tabla. 9.)

Tabla. 6. Mix global para una reacción de PCR de 50 μ L finales de reacción.

Mix Global de reacción de PCR	
Buffer 5X Enzima Q5	10 μ L
dNTPs	1 μ L
Primer Rv J	2.5 μ L
Primer Fw V _H H	4.2 μ L
Q5 polimerasa	0.5 μ L
<i>Enhancer</i>	10 μ L
H2O calidad molecular	c.s.p.

Una vez se preparó cada mix de volumen final 50 μ L, se agregó 10 μ L de molde de cada *miniprep* y se programó el siguiente ciclado (Ver Fig. 15.)

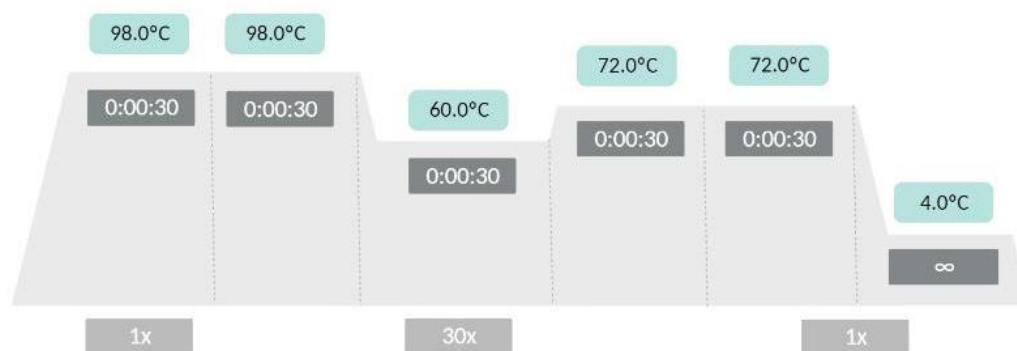


Fig. 15. Diagrama del ciclado de PCR utilizado para la amplificación de secuencias de V_HHs a partir de *minipreps* de clones individuales.

Luego se corrió el producto de *PCR* en una electroforesis en gel de agarosa 1% (Ver metodologías sección 3.2.1.6.) y se separó del plásmido. Seguidamente se recuperó la banda del producto de *PCR* empleando el *kit* de *Monarch DNA Gel Extraction Kit*.

Una vez se obtuvo el producto de *PCR*, se digirió con la enzima de restricción *SfiI* (NEB, #R0123S) 16-24 hrs a 50 °C utilizando el siguiente mix de reacción de 50 µL totales por reacción. (Ver Tabla. 7).

Tabla. 7. Mix de reacción para la incubación con la enzima de restricción *SfiI* para una reacción de 50 µL finales.

Mix de reacción de restricción	
<i>SfiI</i>	1 µL
ADN	1 ug
NEB Buffer 10X	5 µL (1X)
H2O calidad molecular	c.s.p

Una vez se digirió con la enzima de restricción, se inactivó la enzima *SfiI* mediante una precipitación de ADN (ver metodología sección 3.2.1.8) y se cuantificaron los fragmentos de ADN (ver metodologías sección 3.2.1.7).

Finalmente se realizó una ligación de 22,4 ng de cada nanoanticuerpo con 100 ng de vector en una relación molar de 1:3 (vector:inserto) utilizando 1 U de enzima T4

DNA ligasa (Thermo Scientific™, #EL0011) elaborando el siguiente mix de reacción con un volumen final de 40 µL 16-24 hrs a 50 °C. (Ver Tabla .8.)

Tabla. 8. Mix de reacción para la incubación con la enzima de ligación T4 ligasa para una reacción de 40 µL finales.

Mix de reacción de ligación	
Buffer T4 ligasa	4 µL
T4 ligasa	2 µL
Vector pET-28a	100 ng (0,75 µL)
Inserto	22.4 ng
H2O calidad molecular	c.s.p.

Una vez se finalizó la ligación, se inactivó la enzima por 5 minutos a 95 °C y se transformaron bacterias *E. coli Lemo21*(DE3) (Ver metodologías sección 3.2.1.2) con las ligaciones incluyéndose los controles pertinentes. Luego se plaqueó cada ligación en placas *LB* agar con Cloranfenicol y Kanamicina sin diluir, concentrados y dilución 1/10. Se incubaron 16-24 hrs a 37 °C. Al día siguiente se cuantificó el número de colonias totales.

3.2.1.14. Secuenciación

A la hora de secuenciar determinadas muestras, primero se realizó un precultivo (Ver metodología sección 3.2.1.4.) y al día siguiente se realizó una *miniprep* siguiendo el protocolo del kit NZYtech y se cuantificó la concentración de cada muestra mediante absorbancia a 260 nm utilizando el lector de microplaca *Infinite® M200 PRO NanoQuant* (Tecan), la placa *NanoQuant Plate* y el software *i-control* (Ver metodologías sección 3.2.1.7).

Una vez obtenida la cuantificación de cada muestra, se alicuotó 15 µL de cada una en un tubo *Eppendorf®*, se rotuló según el tipo de clon y se empaquetó. Una vez pronto, se enviaron las muestras a la empresa Macrogen (Corea del Sur) para realizar la secuenciación mediante el método de Sanger.

Se ordenó realizar una secuenciación en un solo sentido con el *primer forward* Ompseq de secuencia: 5'-AAG ACA GCT ATC GCG ATT GCA G-3' que hibrida sobre la secuencia OmpA de localización periplasmática. Una vez obtenidas las secuencias, se analizó su calidad según los datos de los electroferogramas y se identificó el marco abierto de lectura correspondiente a los V_HHs. (Ver Tabla 1. Anexo.)

3.2.1.15. Generación de una biblioteca de Nanoanticuerpos

Se procedió a la generación de bibliotecas de nanoanticuerpos en el virus bacteriófago M13 partiendo de linfocitos B aislados de la sangre periférica del animal utilizado el protocolo puesto a punto en la tesis de grado de Franco Bernasconi *et. al* (74). Una vez cumplido el cronograma de inmunización de la llama.

Dos semanas después de la cuarta inmunización se extrajeron 200 mL de sangre periférica del ejemplar inmunizado, utilizando citrato de sodio al 3,2 % como agente anticoagulante en una relación volumétrica 1:4. Se diluyó la totalidad de sangre extraída en *PBS* utilizando una relación 1:1 y se aislaron las PBMC siguiendo las recomendaciones del fabricante de Ficoll-PaqueTM Plus.

Una vez aislados los linfocitos de sangre periférica, se procedió a la extracción del ARN total de aproximadamente 1×10^8 PBMCs utilizando un método de extracción orgánico empleando el reactivo a base de fenol y tiocianato de guanidinio: TRIzolTM Reagent (InvitrogenTM, #15596026). Para ello, se agregó TRIzolTM a razón de 1 mL cada 10^7 células y se prosiguió con la precipitación del volumen total, siguiendo las recomendaciones del proveedor. Los *pellets* de ARN secos se resuspendieron en agua DEPC y se determinó la concentración por absorbancia a 260 nm (Ver metodologías sección 3.2.1.7). Seguidamente se evaluó la integridad del ARN mediante una electroforesis en gel de agarosa 1 % (Ver metodologías sección 3.2.1.6).

Tras verificar la integridad del ARN total extraído se procedió con su retrotranscripción utilizando el kit *RevertAid First Strand cDNA Synthesis* (Thermo ScientificTM, #K1621) y el primer oligo (dT), siguiendo las recomendaciones del proveedor. La cantidad de *template* por reacción se fijó en 3 µg, y se retrotranscribió un total de 40 µg de ARN. Se incluyó un control positivo utilizando como molde el ARN codificante para el gen de la

gliceraldehído-3-fosfato deshidrogenasa humana (GAPDH) provisto por el kit. La reacción fue llevada a cabo en el termociclador ProFlex™ PCR (Applied Biosystems), de acuerdo con lo establecido por el proveedor.

La amplificación del ADN codificante de las tres familias de V_HHs se realizó con tres *primers forward* (VH1, VH3 y VH4) y uno reverse (JH), que hibridan en el *framework* 1 y 4 respectivamente. Tanto los *primers forward* como el reverse contienen un sitio de reconocimiento para la enzima SfiI en el extremo 5' (GGCCNNNN/NGGCC), permitiendo un clonado dirigido al generarse extremos cohesivos no complementarios luego de la digestión enzimática. (Ver Tabla. 9.)

Tabla .9. Secuencias de los *primers forward* VH1, VH3 y VH4 que hibridan en el *framework* 1 y un *primer reverse* JH que hibrida en el *framework* 4, utilizados para la amplificación del ADN codificante para diferentes familias de VHHs. Todos poseen sitio de corte para la enzima SfiI (negrita).

Cebador	Secuencia (5'-3')
VH1	CATGCCATGACTCG CGGCC CAGG CGGCC ATGGCCAGGTGCAGCTGG TGCAGTCTGG
VH3	CATGCCATGACTCG CGGCC CAGG CGGCC ATGGCCAGGTGCAGCTGG TGGAGTCTGG
VH4	CATGCCATGACTCG CGGCC CAGG CGGCC ATGGCCAGGTGCAGCTGC AGGAGTCGGG
JH	CCACGATTCT GGCCGGCCTGGCC TGAGGAGACRGTGACCTGGGTCC

A partir de los resultados obtenidos en el paso anterior se procedió a la amplificación de VHHs utilizando *Phusion® High-Fidelity DNA Polymerase*, siguiendo las sugerencias del fabricante. Para amplificar la familia VH1 se partió de 2 µL de ADNc mientras que para las familias VH3 y VH4 se partió de 4 µL de molde. En cada *PCR* se adicionó un control positivo y un control negativo de reacción.

En el primer caso se utilizó un plásmido pET28a con un nanoanticuerpo sin especificidad la molécula *target* clonado en él, y para el control negativo se sustituyó el molde por agua DEPC. El producto obtenido también fue analizado en una corrida electroforética en gel de agarosa 1 % (Ver metodologías sección 3.2.1.6.).

Posteriormente, con el objetivo de remover los reactivos de la reacción de PCR, para la posterior digestión enzimática, se utilizó el kit *Monarch[®] PCR & DNA Cleanup Kit* (NEB[®], #T1030S) siguiendo las recomendaciones del fabricante. Finalmente, se procedió a la cuantificación (Ver metodologías sección 3.2.1.7.), y evaluación de pureza mediante el *ratio* A260/A280.

Continuando con la obtención de nanoanticuerpos específicos contra los antígenos de interés, la totalidad de los productos amplificados fueron digeridos con la enzima SfiI (NEB[®], #R0123S) a razón de 7,5 unidades enzimáticas por μg de ADN durante 16 horas a 50 °C.

Posteriormente se realizó una electroforesis en gel de agarosa 1 % (Ver metodologías sección 3.2.1.6.) con el objetivo de purificar el ADN de V_HHs digerido, a partir de la banda correspondiente a su peso molecular. De esta forma se logró separarlo de otros fragmentos amplificados de forma inespecífica y de los extremos cohesivos generados tras el corte. Para ello se utilizó el kit *Monarch[®] DNA Gel Extraction Kit* (NEB[®], #T1020S). Finalmente se cuantificó (Ver metodologías sección 3.2.1.7.).

Luego se realizó el clonado de las secuencias codificantes para V_HHs amplificadas en un vector apropiado para *phage display*, fue necesaria la amplificación del vector fagémido pComb3X y su digestión con la enzima de restricción SfiI.

En primera instancia se procedió a la transformación de la cepa de *E. coli* DH5 α con el vector pComb3X (Addgene, #6389) para su clonado (Ver metodologías sección 3.2.1.2). Se realizaron cultivos de las bacterias transformadas y se extrajo el ADN plasmídico con ayuda del kit *Miniprep* NZYTech (#MB01001). La cantidad de ADN plasmídico digerido por reacción fue de 0,56 μg . Finalmente se realizó una electroforesis en gel de agarosa 1 % (Ver metodologías sección 3.2.1.6.)

Una vez digerido, se precipitó el ADN con acetato de sodio (Ver metodologías sección 3.2.1.8.) y se lo resuspendió en un volumen de agua DEPC adecuado para ser cargado en un gel de agarosa 1 %. (Ver metodologías sección 3.2.1.6.)

Con la finalidad de separar los fragmentos resultantes de la digestión enzimática de pComb3X, y posterior purificación del fragmento de 3,4 kb correspondiente al vector en ausencia del *stuffer*, la totalidad del producto obtenido fue corrido en una electroforesis en gel de agarosa 1 % (Ver metodologías sección 3.2.1.6.). Con el objetivo de evitar la degradación del ADN por la exposición a la luz ultravioleta, se irradiaron únicamente los carriles testigos. La purificación de la banda de interés se realizó mediante el kit Monarch® *DNA Gel Extraction Kit*. Finalmente se cuantificó el ADN obtenido como se establece en el protocolo (Ver metodologías sección 3.2.1.7.).

Una vez digerido y purificado el vector, se realizó la desfosforilación del mismo utilizando fosfatasa alcalina rSAP (NEB®, #M0371S) con el fin de eliminar los grupos fosfato de los extremos 5' que pueden inducir la religación del plásmido. Posteriormente, se evaluó la correcta digestión del vector y su desfosforilación, mediante la comparación de un control positivo de ligación, en el cual se ofrece como inserto el *stuffer* de pComb3X en relación vector: inserto 1:3, con respecto al control de religación en el que se puso a ligar el vector desfosforilado en ausencia de inserto.

En ambas reacciones se empleó la enzima T4 DNA ligasa 5 U/μL (Thermo Scientific™, #EL0014). Posteriormente, se transformó *E. coli* DH5α con dichas reacciones (Ver metodologías sección 3.2.1.2.) y se cultivaron los transformantes selectivamente en medio *LB* sólido suplementado con 100 μg/μL de Ampicilina a 37 °C 16-24 hrs.

Previamente a la reacción de ligación de las bibliotecas, se realizó una electroforesis en gel de agarosa 1 % (Ver metodologías sección 3.2.1.6.) de V_HHs amplificados, digeridos y purificados y vector fagémido digerido, purificado y desfosforilado.

Luego, se procedió a la ligación de 10 μg de vector digerido, purificado y desfosforilado, utilizando como relación molar 1:3 vector: V_HHs, durante 16 horas a 22 °C. El producto de ligación se purificó y concentró utilizando el *kit Monarch® PCR & DNA Cleanup Kit* (5 μg) y se cuantificó (Ver metodologías sección 3.2.1.7.).

Finalizada la ligación, se procedió a la transformación de *E. coli* DH5α mediante electroporación (Ver metodologías sección 3.2.1.2) y se plaqueó selectivamente en *LB* sólido suplementado con 100 µg/µL de Ampicilina a 37 °C 16-24 hrs.

3.2.1.16. Expresión de proteínas a pequeña escala y matraces

Luego de haber determinado las condiciones óptimas de expresión de cada proteína como el tiempo de inducción, concentración de IPTG y concentración de ramnosa (Ver Tabla 10.), se evaluó la expresión de estas a pequeña escala en *Lemo21*(DE3).

De esta manera se electroporaron los plásmidos conteniendo las secuencias de las proteínas a expresar en *Lemo21*(DE3) electrocompetentes (Ver metodologías sección 3.2.1.2), se crecieron precultivos (Ver metodologías sección 3.2.1.4), los cuales luego fueron inoculados (dilución 1/25) en matraces de 50 mL con 10 mL de medio *LB*. Se les agregó 34 µg/mL de Cloranfenicol y 50 µg/mL Kanamicina (Sigma-Aldrich®, #60615), así como también la cantidad de ramnosa necesaria según el caso. Se incubaron a 37 °C y 250 rpm por 2 horas hasta alcanzar una OD_{600nm} de 0.4-0.8 nm, una vez alcanzada la *OD*, se indujeron con la concentración de IPTG óptima según las proteínas. Una vez pasado el tiempo de inducción, se recolectó cada cultivo *Falcon*® y se centrifugaron por 15 min, 4 °C a máxima velocidad. Una vez obtenido el *pellet*, se descartó el sobrenadante y se resuspendió el *pellet* en *PBS* 1X a 1/6 del volumen inicial, se agregó *PMSF* 1X (Thermo Scientific™, #36978) y se sonicó cada tubo *Falcon*® (Ver metodologías sección 3.2.1.17).

Para escalar los cultivos, se realizó el mismo procedimiento descrito anteriormente, utilizando 250 mL de cultivo en matraces de 1 L inoculados con 5 mL de precultivo. (Ver Tabla. 10.)

Tabla. 10. Valores utilizados para la producción de los nanoanticuerpos y la proteína hTL1A.

Proteína	Concentración de IPTG	Concentración de ramnosa	Tiempo Inducción	Temperatura de Inducción
<i>hTL1A</i>	400, 700, 1000 μ M	0, 250, 750, 2000 μ M	16-24 hrs	25 °C
V _H Hs	400 μ M	0, 250, 750, 2000 μ M	5 hrs	37 °C

3.2.1.17. Sonicación pequeña y gran escala

Una vez pasado el tiempo de inducción, se recolectó cada cultivo en tubos Falcon® y se centrifugaron por 15 min, 4 °C a máxima velocidad. Ya obtenido el *pellet*, se descartó el sobrenadante y se resuspendió en PBS-1X a 1/6 del volumen inicial, se agregó PMSF-1X (Thermo Scientific™, #36978)

A la hora de sonicar un cultivo a pequeña escala, se seteo el sonicador (Vibra-Cell™ (Sonics, #VCX 130) con un *timer* de 30 segundos, pulso 16-24 hrs de 2 segundos, pulso *OFF* de 6 segundos y una amplitud de 30 %. Si se trabajó con un cultivo a gran escala, se seteo un *timer* de 15 minutos, pulso 16-24 hrs de 10 segundos, pulso *OFF* de 10 segundos y una amplitud de 60%. Se trabajó siempre en hielo y entre cada cultivo a sonicar, se limpió el equipo con hipoclorito y agua destilada. En todos los casos se agregó inhibidor de proteasas al cultivo antes de sonicar. Finalmente, se centrifugó por 10 minutos, 14000 xg y 4 °C para separar el *pellet* del clarificado.

3.2.1.18. Purificación de proteínas

Se llevó a cabo la purificación de los clarificados de los nanoanticuerpos y hTL1A mediante una cromatografía FPLC-IMAC, utilizando el equipo ÄKTA Avant 25 (G.E. Healthcare Life Sciences) y la columna HisTrap Chelating HP 1 mL® (G.E. Healthcare Life Sciences), pre-empaquetada con sefarosa, que presenta como ligando el ácido iminodiacético (IDA) y cargada con la solución de sulfato de níquel 100 mM.

Todas las soluciones utilizadas fueron previamente filtradas (con el equipo Merck Millipore 38 Sterifil™ 47mm *Aseptic Vacuum Filter System*) utilizando filtros de

membrana (Merck Millipore de 0.22 μm) y desgasificadas para eliminar, precipitados, células o burbujas de gas.

Los sonicados de las proteínas fueron centrifugadas en tubos *Nalgene* a 14000 xg por 30 minutos. Luego se les adicionó imidazol (20 mM) y NaCl (300 mM) al sobrenadante para conseguir la misma concentración del buffer A. Finalmente fue filtrada con el equipo Merck Millipore 38 Sterifil™ 47mm *Aseptic Vacuum Filter System* utilizando filtros de membrana Merck Millipore de 0.22 μm .

Para configurar el método, se utilizó el software Unicorn™ 7.0. Se configuró el flujo a 1 mL/min para todas las etapas. Se equilibró la columna con 100% de buffer A (20 mM imidazol), 5 CV. Luego, se aplicaron 40 mL aproximados de muestra, que consistió en la fracción soluble del lisado de cada proteína. Seguidamente se realizaron lavados con 0%, 4% y 6% de buffer B hasta estabilizar los niveles de absorbancia.

Posteriormente, se llevó a cabo la elución con 100% de buffer B (500 mM imidazol), y se colectó el pico obtenido en fracciones de 0.5 mL. Por último, se realizó un lavado con 100% de buffer B, 5 CV, y un lavado final con agua mQ®, 5 CV. La columna se almacenó tras el pasaje de 5 CV de Etanol 20%. Los resultados se procesaron en el software Unicorn™ 7.0.

El imidazol fue removido mediante diálisis contra PBS-1X para los nanoanticuerpos y Tris-Base 10 mM, NaCl 100 mM y β -mercaptoetanol 1 mM en 1L de solución. Se realizaron tres cambios de solución cada 3 hrs. Se utilizó una membrana de 14 kDa de *cut-off*. Las alícuotas dializadas fueron almacenadas a -80 °C.

Las proteínas purificadas y dializadas se cuantificaron mediante UV midiendo absorbancia a 280 nm en el equipo Infinite® M200 PRO NanoQuant (Tecan) (Ver metodologías sección 3.2.1.19.2). Finalmente se corrió un gel *SDS-Page* de poliacrilamida 15% con los purificados de las proteínas dializadas (Ver metodologías sección 3.2.1.3.).

3.2.1.19. Cuantificación proteica

Para cuantificar proteínas se utilizaron dos metodologías diferentes y se validó la medición de la concentración proteica mediante UV (absorbancia) utilizando el método de *BCA*.

3.2.1.19.1. *BCA*

La cuantificación de proteínas se realizó mediante el ensayo del ácido bicinonónico (*BCA*). Para ello se prosiguió acorde a las recomendaciones establecidas en el protocolo de Sigma-Aldrich® #BCA1 y #B9643-1L-KC. Se preparó el reactivo de trabajo con 50 partes de reactivo A (*Bicinchoninic Acid solution*) y una parte de reactivo B (sulfato de cobre pentahidratado al 4 %).

Los ensayos se realizaron en placas de microtitulación de 96 pocillos en las que se realizaron las mezclas de 8 partes de reactivo de trabajo con una parte de la muestra de proteínas a analizar (200 µL de reactivo de trabajo y 25 µL de muestra).

Para los ensayos de *BCA* se construyó una curva estándar de BSA a partir del “*Protein standard*” (Sigma Aldrich®, #P0914) utilizando concentraciones de 200, 400, 600, 800 y 1000 µg/mL, por duplicado. Las muestras a analizar también se evaluaron por duplicado.

Una vez realizadas todas las mezclas, se incubó 15 minutos a 60 °C y finalmente se midió la absorbancia a 562 nm en el equipo lector de microplaca *Infinite® M200 PRO NanoQuant (Tecan)*, la placa *NanoQuant Plate* y el *software i-control*. Se graficó la curva estándar en el software de *Microsoft Excel (2022)*, realizándose un ajuste lineal que arroje un valor de R^2 y la ecuación del gráfico. La concentración proteica de las muestras se calculó mediante interpolación de los valores de absorbancia en la curva estándar.

3.2.1.19.2. UV

Para cuantificar la concentración proteica mediante absorbancia a 280 nm se utilizó el equipo lector de microplaca *Infinite® M200 PRO NanoQuant (Tecan)*, la placa *NanoQuant Plate* y el *software i-control*.

Se colocó 2 µL de solución blanco sobre cada pocillo de la placa y se midió la absorbancia a 280 nm y 310 nm. Se calculó la diferencia de absorbancias entre la longitud de onda de referencia (310 nm) y la longitud de onda de interés (280 nm). Luego, se repitió el procedimiento con las muestras a evaluar. Finalmente, realizando el ajuste de blancos, se utilizó la ecuación de *Lambert Beer* para calcular la concentración proteica $Abs = C \times \epsilon \times l$.

Siendo “C” la concentración proteica que queremos obtener, “ε” el coeficiente de extinción molar (se obtuvo del sitio bioinformático *Expasy Protogram*), en este caso 1.8 ml mg⁻¹ cm⁻¹ para los nanoanticuerpos y para hTL1A 1.05 ml mg⁻¹ cm⁻¹; y “l” el paso óptico el cual depende del instrumento de medición, en este caso 0.05 cm.

3.2.1.20. Chequeo de identidad por *Western Blot*

Se llevó a cabo un *Western Blot* colocando en un pocillo *Lemo21(DE3)* sin transformar y en el resto de los pocillos se colocó el sonificado de hTL1A expresado con distintas concentraciones de ramnosa (0, 250, 750 y 2000 mM). Para esto, se llevó a cabo la producción de *Lemo21(DE3)* sin transformar (Ver metodologías sección 3.2.1.16).

Una vez obtenidos todos los lisados, se procedió a llevar a cabo el *Western Blot*. Se elaboró un gel de poliacrilamida de 15% (Ver metodologías sección 3.2.1.3) y luego se transfirió a la membrana de *PVDF* (AmershamTM Hybond[®] P *Western blotting membranes*, GE Healthcare) previamente activada con metanol por 10 segundos, posteriormente lavada con agua destilada por 5 minutos y luego equilibrada con el buffer de transferencia Tris-Glicina.

Se procedió con el armado del *Western Blot sandwich*, que consiste en apilar esponja, papel de filtro, membrana de *PVDF*, gel de electroforesis, papel de filtro y esponja, en este orden. Finalmente, el sándwich se colocó en la cuba de *Western Blot* con el buffer de transferencia Tris-Glicina. La corrida se realizó a 4 °C, con un amperaje constante de 300 mA.

Luego de realizada la transferencia se desarmó el sistema, se retiró la membrana, se enjuagó con agua destilada y se colocó en solución de bloqueo (*PBS 1X 5% m/v* leche descremada y 0,1 %v/v *Tween*[®] 20), a 4 °C 16-24 hrs. Posteriormente se enjuagó la membrana con *PBS-1X 0,05%v/v Tween*[®] 20 y se procedió a la incubación con el anticuerpo primario un anticuerpo anti hTL1A, (dilución 1/500) durante 1 hr a 25 °C y 100 rpm.

Transcurrido el tiempo se realizan 3 lavados de 10 minutos con *PBS 1X 0,05 %v/v Tween*[®] 20 a 100 rpm. Se incubó con el anticuerpo secundario anti-IgG de conejo conjugado a fosfatasa alcalina, *Goat Anti-Rabbit IgG (H+L) Alkaline Phosphatase Conjugated* (Thermo Scientific, #31346) (dilución 1/30000), durante 1 hr a 25 °C y 100 rpm. A continuación, se realizaron 6 lavados de 5 minutos con *PBS 1X 0,05 %v/v Tween*[®] 20 a 100 rpm.

Se realizó un último enjuague con agua destilada y se continuó con el revelado. Para el revelado, se cubrió la membrana con aproximadamente 3 ml de la solución premezclada de *BCIP/NBT* y se incubó a temperatura ambiente durante hasta que se desarrolló el color. Finalmente se detuvo el desarrollo de color agregando agua destilada para detener la reacción.

3.2.1.21. Descongelado de líneas celulares

Para el descongelado de crioviales almacenados en un tanque de nitrógeno líquido (Taylor Wharton Cryo Refrigerator HC20, *Fisher Scientific*), se comenzó por termostatar 9 mL de *Dulbecco's Modified Eagle Medium High Glucose* (4.5 g/L) (Capricorn Scientific, *DMEM-HPSTA*) a 37 °C. Se retiró el criovial del tanque de nitrógeno líquido y se descongeló en un baño a 37 °C.

Posteriormente en cabina de flujo laminar se mezcló el *DMEM* termostatzado con el contenido del criotubo y se centrifugó a 260 xg por 5 minutos. Se descartó el sobrenadante y se resuspendió en 1 mL de *Dulbecco's Modified Eagle Medium High Glucose* (4.5 g/L) (*Capricorn Scientific, DMEM-HPSTA*) enriquecido con 10% de suero fetal bovino (*Capricorn Scientific, SFB-11A*). Se realizó el recuento celular y se determinó la viabilidad celular realizando una tinción con *Trypan blue* en metanol y contando en cámara de *Neubauer* (Marienfeld 0,100 mm / 0,0025 mm²).

Posteriormente se transfirieron las células a una botella o placa de cultivo celular y se cultivaron en incubadora (Thermo Scientific Forma[®] Series II *Water Jacketed CO₂ Incubator*) a 37 °C en una atmósfera con 5% de CO₂.

3.2.1.22. Tripsinización de células adherentes

Para despegar las células que crecen en adherencia, se retiró el medio de cultivo, se lavó con PBS-1X y se agregaron 20 µl/cm² de solución de Tripsina-EDTA (Sigma, T3924-500ML). Se incubó de 5 a 15 minutos en la incubadora hasta que las células se observaran redondeadas y despegadas de la botella. A continuación, se inactivó la tripsina agregando *DMEM* 10% SFB. Se resuspendieron las células y realizó recuento, repique o siembra según fue necesario.

3.2.1.23. Generación de una biblioteca de fagos a partir de una biblioteca de fagémidos

Se realizó la conversión de un *output* previamente trabajado por el grupo desde su formato de *miniprep* de plásmido pComb3X (biblioteca de fagémidos) a formato de biblioteca de fagos. Para ello se procedió a realizar 4 electroporaciones de 2 µL c/u de *miniprep* de plásmido pComb3X con 30 µL de bacterias *TG-1*. Se recuperaron en *Recovery Medium* (Lucigen, #80030-1) frío y se incubaron por 40 minutos a 37 °C. En paralelo, 10 µL se apartaron para realizar titulación de este (Ver metodologías sección 3.2.1.12)

Luego de la recuperación, se agregaron los 4 mL de las electroporaciones a 10 mL de *SB* en un matraz de 50 mL. Se adicionó 5.6 µL de Ampicilina a 100 µg/mL y se incubó

por 1 hr a 37 °C y 250 rpm. Luego de la hora, se le adicionaron 17 µL de Ampicilina 100 µg/mL, repitiendo las condiciones de incubación.

Transcurrido el tiempo, se escaló el contenido a un matraz de 1 L conteniendo 186 mL de medio *SB*. Se adicionaron 2 mL de Fago *Helper* y se incubó por 2 hr a 37 °C y 300 rpm. Finalmente, luego del tiempo de incubación se incubó 16-24 hrs a 37 °C y 300 rpm con 280 µL de Kanamicina a 70 µg/mL. Al día siguiente se procedió a realizar la precipitación del *output* generado.

Se colocó el cultivo en un tubo *Falcon*[®] y se centrifugó durante 20 min, a 4°C y 3000 xg, pasado el tiempo, se cambió el cultivo a otro *Falcon*[®] y se volvió a centrifugar en las mismas condiciones. Luego se pasó el cultivo a un tubo *Nalgene*, se agregó 1/5 de volumen de PEG-NaCl (PEG-8000, Sigma-Aldrich[®], #154660) y se incubó por 1 hr en hielo a 4 °C. Pasado el tiempo, se centrifugó a 14000 xg, 4 °C y 30 minutos.

Finalmente se descartó el sobrenadante y se resuspendió en 2 mL de PBS-1X-BSA 3% (BSA, Sigma-Aldrich[®], #A2153) y se agregó 300 µL de inhibidor de proteasas (*cOmpleteTM Protease Inhibitor Cocktail 7X Roche*, #11836170001). Una vez pronto, se utilizó en la siguiente ronda o se almacenó a -80 °C.

3.2.1.24. Generación de sobrenadantes de nanoanticuerpos en pComb3X y pET-28a para su uso en *Screening*

Para generar los sobrenadantes que se emplearán en la incubación de *screening* de pComb3X, se llevaron a cabo precultivos (Ver metodologías sección 3.2.1.4.) de determinada cantidad de colonias de un *output* de la ronda de *panning* de interés en células TG-1.

Las mismas se crecen durante 2 a 3 hrs a 37 °C y 250 rpm en medio *SB*, hasta alcanzar una OD_{600nm} de 0.6-0.8 UA. En ese momento se adiciona IPTG a una concentración de 2 mM y se deja en incubación 16-24 hrs para permitir que las células senescentes liberen su contenido periplasmático, liberando los nanoanticuerpos al medio. Al día siguiente se centrifugaron a 4 °C, 15000 g por 20 minutos para obtener los sobrenadantes.

En el caso de realizar sobrenadantes de pET-28a, se crecen precultivos 16-24 hrs, a 37°C y 250 rpm, de las colonias de interés. Al otro día, se inoculan *Falcons* de 50 mL con 10 mL de medio SB y precultivo en dilución 1/50 y se deja crecer durante 2 hrs. Se induce con 400 µM de IPTG por 4 hrs. Pasado el tiempo se centrifuga a 4 °C, 15000 g por 20 minutos para obtener los sobrenadantes, se resuspenden en PBS-1X en 1/6 del volumen y se sonicar. (Ver metodologías sección 3.2.1.17)

3.2.2. Expresión transitoria de hTL1A en células HEK-293 y Citometría de Flujo

3.2.2.1. Transfección por Lipofectamina

Para los ensayos de detección de hTL1A por citometría de flujo, se trabajó con la línea celular HEK 293, derivada de células humanas embrionarias de riñón (ATCC CRL-1573). Las mismas fueron cultivadas en *DMEM* (4.5 g/L) (Capricorn Scientific, DMEM-HPSTA). Las botellas y placas de cultivo que se trabajaron son *Cellstar de Greiner*, y los filtros *Millex-GV* de 0.22 µM (*Merck*). Se utilizó una incubadora de CO₂ a 5 % en 37°C. Todas las transfecciones fueron realizadas con Lipofectamina 2000 (#11668019, *ThermoScientific*).

Se partió de un vial de trabajo, plaqueando las células en una botella T-25 y expandiendo el cultivo. Luego, 24 hrs previo a la transfección y tras obtener una confluencia de 90-95%, se plaquearon a 2x10⁵ células/pozo para una placa de 24 pocillos y 4x10⁵ células/pozo en una placa de 12 pocillos.

Seguido, se realizó la transfección con Lipofectamina a partir de las instrucciones del fabricante, con el plásmido *pCDNA3.1_hTL1A* y el control *pCDNA3.1_GFP* (2.4 ug por placa de 24 pocillos). Éste vector está diseñado para la expresión constitutiva de proteínas en líneas celulares de mamíferos, bajo el *enhancer* y promotor del Citomegalovirus (CMV) y es utilizado para todas las transfecciones realizadas.

Se utilizó una relación de ADN:Lipofectamina de 1:2. Transcurridas 4-6 horas se realizó un cambio de medio a los pocillos, agregando *DMEM* 10% SFB y se incubaron a 37 °C en una atmósfera de 5% CO₂ durante 35-48 horas. Las células se despegaron

tal y como se describe en el protocolo general (Ver metodologías sección 3.2.1.23) y se analizaron por citometría de flujo.

3.2.2.2. Marcaje y análisis por citometría de flujo

Una vez tripsinizadas, se centrifugaron las células a 400 *xg* por 5 minutos a 4°C. Se descartó el sobrenadante y se resuspendió en 1 mL de PBS-1X frío. Se repitieron las condiciones de centrifugación y se resuspendió el *pellet* en 100 µL de PBS-1X frío. La muestra se mantuvo en hielo en todo momento.

Para el marcaje con anticuerpos control, nanoanticuerpos generados en los procesos de *panning*, y/o receptor (hDR3), se agregó a la muestra la concentración definida para cada molécula (Ver Tabla 11.) y se incubó en hielo 1 hora en oscuridad. Posteriormente se agregaron 900 µL de PBS-1X frío y se centrifugó a 400 *xg* por 5 minutos a 4°C. Se realizaron dos lavados más con 1 mL de PBS-1X frío y se resuspendió finalmente en 100 µL de PBS-1X.

Las muestras fueron analizadas en el equipo utilizado *BD Accuri™ C6 Plus Flow Cytometer* (BD BioSciences), perteneciente al Institut Pasteur de Montevideo bajo la supervisión de un técnico especializado.

Tabla. 11. Concentraciones de marcaje, citometría de flujo anti-TL1A.

Concentraciones de Reactivos de Marcaje	
Anti-TL1A Monoclonal Control + (#FAB74422R, R&D Systems)	1 µL (1/100)
Nanoanticuerpo	1 ug
anti-HA (#ab72564, Abcam)	1.5 µL (1/300)
hDR3	2 ug
anti-hFc (eBioscience #12-4998-82)	2 µL

3.2.3. Generación de un banco celular de la línea TF-1, DH82 y U87-MG para ensayos de actividad

Para la generación de un banco de células TF-1, DH82 y U87-MG, utilizadas para ensayos de actividad *in-vitro* de los nanoanticuerpos generados, se procedió a descongelar la línea celular proveniente directamente del proveedor (ATCC), tal y como se describe en los procedimientos generales (Ver metodologías sección 3.2.1.21.)

Las células fueron crecidas en medio RPMI-1640 (RPMI-A, Capricorn), suplementada con GM-CSF a 2 ng/mL y una concentración de SFB 10%. Se crecieron hasta tener suficientes para generar 5 viales de *Master Cell Bank*, y 5 viales de *Working Cell Bank*, a una concentración de $2-10 \times 10^6$ células/vial.

Para su congelado, se centrifugaron las células a 200 *xg* por 5 minutos. Se retiró el sobrenadante y se resuspendieron las células en medio de congelación (90% SFB y 10% DMSO). Se alicuotó en criotubos y se colocó en un *Mister Frosty*TM, a -80°C durante 24 horas para permitir su congelación a 1°C/min. Finalmente se trasladaron a un tanque de nitrógeno.

4. Resultados y discusión

Los resultados serán divididos en dos proyectos según las moléculas *target* a evaluar: TL1A e interleuquinas.

4.1. Proyecto TL1A

El objetivo principal del proyecto TL1A es generar nanoanticuerpos capaces de inhibir la unión de hTL1A con su receptor celular hDR3, para el tratamiento de la psoriasis. Para ello, primero se debieron producir dichos nanoanticuerpos, analizar el reconocimiento por su molécula *target* hTL1A y finalmente probar su inhibición.

Lo primero que se llevó a cabo fue la optimización de la producción y purificación de los nanoanticuerpos en cuestión, así como de la proteína hTL1A debido a que la obtenida de forma comercial, se encontraba degradada.

4.1.1. Optimización la expresión, inducción y purificación de los nanoanticuerpos en sistemas procariotas

Con el objetivo de optimizar la expresión de los nanoanticuerpos α -hTL1A, en primera instancia, se evaluó el sistema de producción procariota empleado en proyectos de tesis anteriores utilizando la cepa *Rosetta* de *E. coli*. Se analizó la intensidad de banda de cada nanoanticuerpo de aproximadamente 15 kDa (Ver Fig. 16.)

Para esto, tras electroporar las bacterias *E. coli Rosetta* electrocompetentes con los plásmidos pET-28a codificantes para los nanoanticuerpos α -hTL1A cedidos por nuestra tutora. (Ver metodologías sección 3.2.1.16). Para realizar este ensayo, se indujo la expresión con 3 μ M de IPTG (#12481C50, *Gold Biotechnology*).

Se expresó durante 4 hrs a 37 °C en *shaker* a 250 rpm. Una vez transcurrido el tiempo necesario, se centrifugó y se resuspendió en *PBS-1X* en 1/5 del volumen. Una vez producidos, se sonicaron los precultivos y se corrió un gel de poliacrilamida 15% *SDS-Page* con los sonicados de cada nanoanticuerpo (Ver metodologías sección 3.2.1.3.).

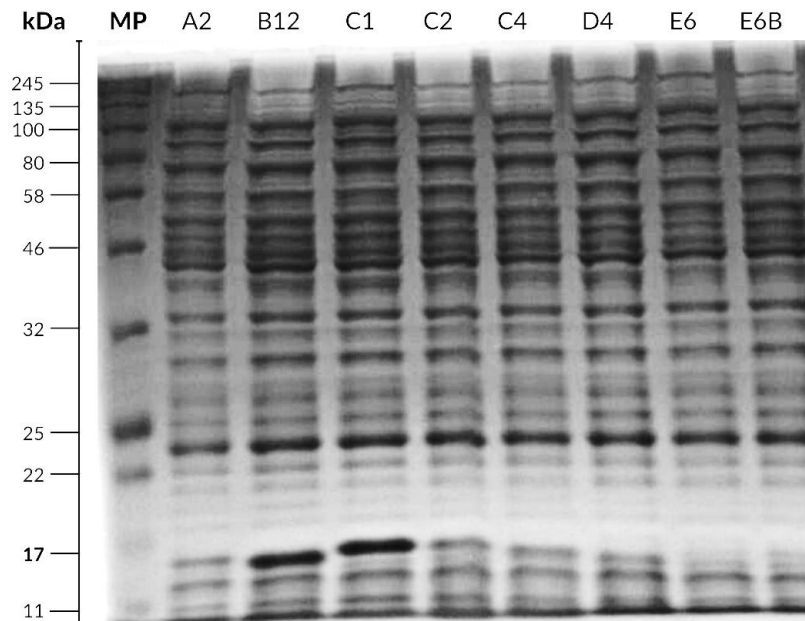


Fig. 16. Análisis mediante electroforesis *SDS-Page* de la expresión de los nanoanticuerpos α -hTL1A. Carril MP: *PageRuler™ Prestained Protein Ladder*, carril A2: nanoanticuerpo α -hTL1A B12, carril 3: nanoanticuerpo α -hTL1A B12, carril C1: nanoanticuerpo α -hTL1A C1, carril C2: nanoanticuerpo α -hTL1A C2, carril C4: nanoanticuerpo α -hTL1A C4, carril D4: nanoanticuerpo α -hTL1A D4, carril E6: nanoanticuerpo α -hTL1A E6 y carril E6B: nanoanticuerpo α -hTL1A E6B. La banda correspondiente se encuentra alrededor de los 15 kDa.

Se puede observar una banda intensa de aproximadamente 15 kDa en los carriles de los nanoanticuerpos B12 y C1, mientras que el resto de los carriles no presentan una banda de buena intensidad a esa altura, lo que indica que el resto de los mismos no se están expresando de igual manera.

Una de las posibles causas de esta problemática puede ser la potencial toxicidad de los nanoanticuerpos. Este sistema presenta una expresión basal (en estado no inducido) significativa. En casos en que las proteínas resultan tóxicas para la célula, estos niveles de expresión son suficiente para afectar el crecimiento celular, lo que no solamente deriva en la obtención de una menor cantidad de células productoras de la proteína de interés, sino también en un descenso de la expresión proteica en las células sobrevivientes.

Éste no fue el único inconveniente encontrado, sino que los niveles de expresión de los nanoanticuerpos B12 y C1 tampoco fueron reproducibles en diferentes *batches* de producción.

Debido a esta expresión irregular utilizando la cepa *Rosetta* de *E. coli*, se decidió evaluar la expresión proteica en otra cepa de *E. coli*. Con este fin se decidió probar la cepa de *E. coli Lemo21(DE3)* que *a priori* podría controlar más eficientemente la expresión basal de los nanoanticuerpos. [75]

Lemo21(DE3) es una cepa diseñada para la expresión de proteínas desafiantes, incluidas proteínas de membrana, proteínas tóxicas y proteínas con problemas de solubilidad, ya que permite una fina regulación de los niveles de la proteína de interés, y disminuye significativamente su expresión basal (sin inductor). En la cepa *Lemo21(DE3)*, la actividad de la T7 ARN polimerasa puede ser modulada precisamente por su inhibidor natural, la lisozima (*lysY*), que se expresa a partir de un plásmido que contiene un promotor controlado por ramnosa. El nivel de lisozima se modula añadiendo L-ramnosa al cultivo. Cuando se cultiva *Lemo21(DE3)* sin ramnosa, la cepa se comporta igual que una cepa que contiene pLysS.

En presencia de ramnosa, se activa la expresión de la lisozima, que se une e inhibe a la T7 polimerasa. Cuanta más concentración de ramnosa, mayores niveles de expresión de LysY. En la situación ideal, en ausencia de IPTG, la T7 polimerasa que se expresa basalmente (*leakage*) será inhibida por la LysY que se expresa en presencia de ramnosa, lo que derivará en una disminución significativa de la expresión basal de los nanoanticuerpos en cuestión en los primeros estadios del crecimiento celular (notar que en el plásmido pET-28a, la expresión del nanoanticuerpo se encuentra bajo el control del promotor T7). Una vez alcanzado el crecimiento bacteriano óptimo, se adiciona IPTG al medio, para que se induzca la expresión de la T7 polimerasa, cuyos niveles deben sobrepasar a los de su inhibidor para lograr producir la expresión del nanoanticuerpo. (Ver Fig. 17.).

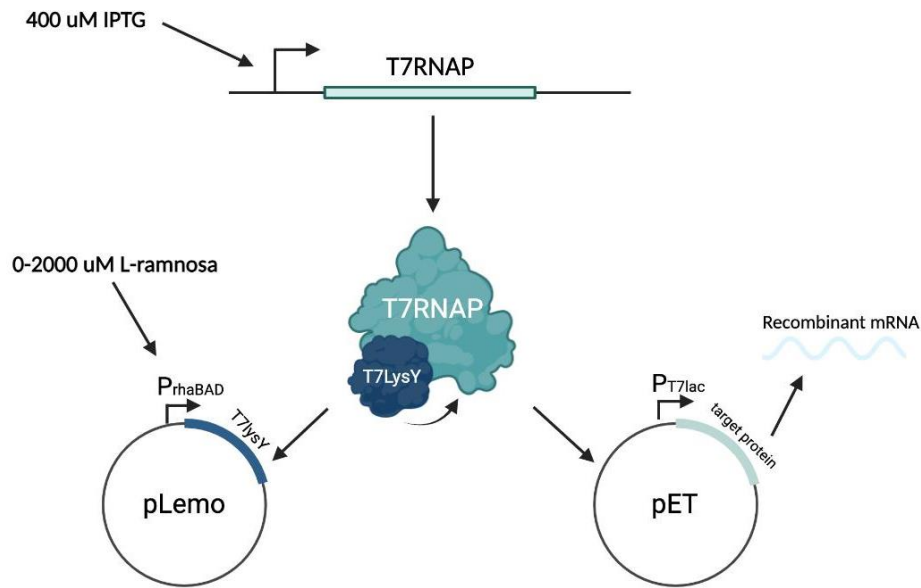


Fig. 17. Mecanismo de expresión proteica en las bacterias *Lemo21(DE3)*.

Se electroporaron bacterias competentes *Lemo21(DE3)* (Ver metodologías sección 3.2.1.2) con los mismos plásmidos codificantes para los distintos nanoanticuerpos anti-TL1A y se evaluaron diferentes condiciones de expresión variando el tiempo de inducción (5 hrs y 16-24 hrs), y la concentración de ramnosa (0, 250, 750, 2000 μM) (Ver Fig. 18).

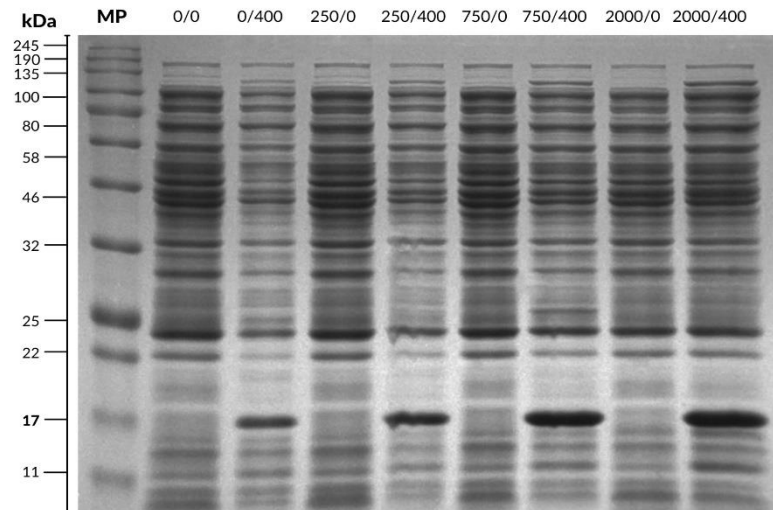


Fig. 18. Análisis mediante electroforesis *SDS-Page* de la expresión del nanoanticuerpo C1 α-hTL1A mediante el agregado de diferentes concentraciones de IPTG y ramnosa en una inducción de 5 hrs. Carril MP: *PageRuler™ Prestained Protein Ladder*, carril 0/0: 0 μM de ramnosa y 0 μM de IPTG, carril 0/400: 0 μM de ramnosa y 400 μM de IPTG, carril 250/0: 250 μM de ramnosa y 0 μM de IPTG, carril 250/400: 250 μM de ramnosa y 400 μM de IPTG, carril 750/0: 750 μM de ramnosa y 0 μM de IPTG, carril 750/400: 750 μM de ramnosa y 400 μM de IPTG, carril 2000/0: 2000 μM de ramnosa y 0 μM de IPTG y carril 2000/400: 2000 μM de ramnosa y 400 μM de IPTG.

Como punto de partida, se utilizó uno de los nanoanticuerpos α -hTL1A, denominado C1 para evaluar las mejores condiciones de inducción. En cada carril se sembró el sonicado inducido con las diferentes concentraciones de ramnosa (0, 250, 750 y 2000 μ M) y dos concentraciones de IPTG (0 μ M, para evaluar los niveles basales de expresión de nanoanticuerpo y 400 μ M) En la figura se muestran los resultados obtenidos tras realizar inducciones 16-24 hrs. (Ver Fig. 19.)

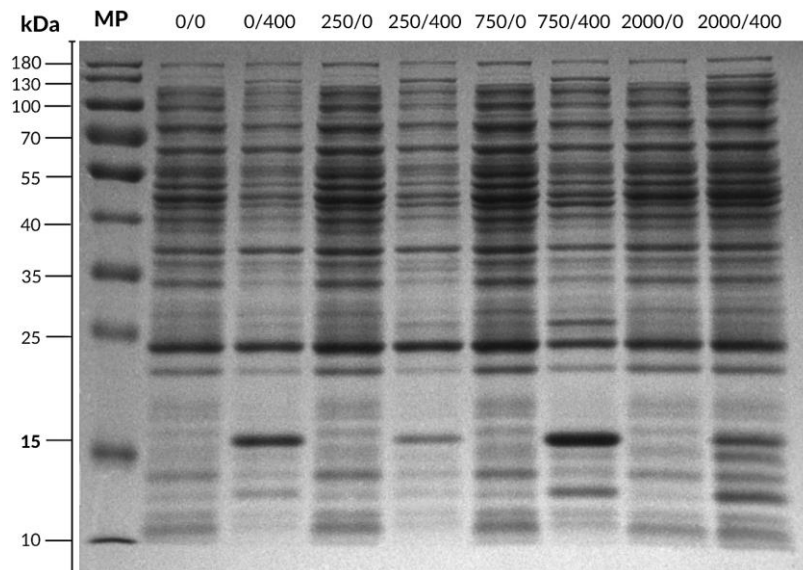


Fig. 19. Análisis mediante electroforesis *SDS-Page* de la expresión del nanoanticuerpo C1 α -hTL1A mediante el agregado de diferentes concentraciones de IPTG y ramnosa en una inducción de 16-24 hrs. Carril MP: *PageRuler™ Prestained Protein Ladder*, carril 0/0: 0 μ M de ramnosa y 0 μ M de IPTG, carril 0/400: 0 μ M de ramnosa y 400 μ M de IPTG, carril 250/0: 250 μ M de ramnosa y 0 μ M de IPTG, carril 250/400: 250 μ M de ramnosa y 400 μ M de IPTG, carril 750/0: 750 μ M de ramnosa y 0 μ M de IPTG, carril 750/400: 750 μ M de ramnosa y 400 μ M de IPTG, carril 2000/0: 2000 μ M de ramnosa y 0 μ M de IPTG y carril 2000/400: 2000 μ M de ramnosa y 400 μ M de IPTG.

Se pueden observar bandas de expresión a una altura aproximada de 15 kDa únicamente en los carriles donde se indujo con 400 μ M de IPTG (por recomendación del proveedor) tanto en la inducción 16-24 hrs como en la de 5 hrs (Ver. Fig. 18.). De esta manera confirmamos la necesidad de inducir con IPTG para obtener una buena expresión proteica, y que el mecanismo de control de *leakage* funciona correctamente y elimina la expresión basal citotóxica previo a la inducción.

Comparando los distintos tiempos de inducción, se observan bandas más intensas (mayor producción) en las inducciones de 5 hrs en comparación con la inducción 16-24 hrs para todos los casos. Esto puede deberse a una saturación de la maquinaria celular durante la expresión 16-24 hrs, lo cual conlleva a una agregación de los nanoanticuerpos en cuerpos de inclusión.

Debido a que solo se analizó la fracción soluble, es probable que se perdiera gran cantidad de proteína inducida en la fracción insoluble.

Por otro lado, en una inducción de 5 horas, se le permite a la bacteria realizar la expresión de forma limitada y se evita la acumulación en cadena en cuerpos de inclusión, generando así mayor productividad de nanoanticuerpos solubles de expresión periplásmica.

Por otra parte, tras 5 hrs de inducción se observa una tendencia de aumento de intensidad de banda al aumentar la concentración de ramnosa, lo que indica que a mayor represión basal de la T4 polimerasa, mayor es la producción de nanoanticuerpo, tras la inducción de iguales concentraciones de IPTG, indicando que aún los muy bajos niveles de expresión basal del nanoanticuerpo (no se alcanzan a observar en el *SDS-Page*, ver condiciones de concentración nula de IPTG en la fig. 19) afectan negativamente el resultado final de la producción, lo que sugiere que al menos el nanoanticuerpo C1 ejerce un posible efecto tóxico sobre las células aún a muy bajas concentraciones. Al obtener estos resultados, se decidió utilizar 750 μM de ramnosa ya que se obtuvieron resultados similares y de esta manera se ahorra reactivo.

Una vez se obtuvieron todos los resultados anteriores, se establecieron las siguientes condiciones como las óptimas para la producción de nanoanticuerpos: 5 hrs de inducción, 400 μM de IPTG (recomendado por la casa comercial) y 750 μM de ramnosa.

Finalmente se llevó a cabo la expresión de todos los nanoanticuerpos $\alpha\text{-hTL1A}$ a pequeña escala utilizando las condiciones elegidas con el fin de evaluar si se conseguía una buena expresión para todos los clones y se corrió un gel de poliacrilamida *SDS-Page* 15% con los sonicados de cada nanoanticuerpo. (Ver Fig. 20.)

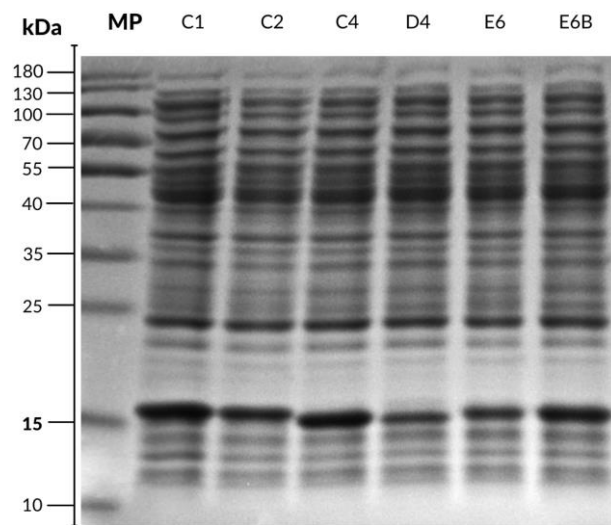


Fig. 20. Análisis mediante electroforesis *SDS-Page* de la expresión de los nanoanticuerpos α -hTL1A con una inducción de 5hs con 400 μ M de IPTG y 750 μ M de ramnosa. Carril MP: *PageRuler™ Prestained Protein Ladder*, carril C1: nanoanticuerpo α -hTL1A C1, carril C2: nanoanticuerpo α -hTL1A C2, carril C4: nanoanticuerpo α -hTL1A C4, carril D4: nanoanticuerpo α -hTL1A D4, carril E6: nanoanticuerpo α -hTL1A E6, carril E6B: nanoanticuerpo α -hTL1A E6B.

La figura anterior (Ver Fig. 20) muestra que se obtuvieron bandas de mayor intensidad con las condiciones óptimas elegidas para la cepa *Lemo21*(DE3), que las bandas obtenidas inicialmente utilizando la cepa *Rosetta*, lo que indica mayores niveles de producción de nanoanticuerpos, gracias al mejor control de la expresión basal de los mismos al emplear los mecanismos moleculares de *Lemo21*(DE3).

4.1.2. Producción a escala de matraz 250 mL de los nanoanticuerpos

Una vez que se eligieron las mejores condiciones de tiempo de inducción, concentración de IPTG y concentración de ramnosa según la producción a pequeña escala, se llevó a cabo la expresión de todos los nanoanticuerpos en gran escala utilizando matraces de 1 L. Esto se realizó con el fin de obtener mayor cantidad de cada nanoanticuerpo para poder purificarlos y utilizarlos en ensayos *in vitro* en *ELISA*.

Para ello, se inocularon 250 mL de medio de cultivo con una proporción 1/50 de precultivo y se indujo la expresión con 400 μ M de IPTG por 5 hrs a 37 °C y 250 rpm.

Una vez realizada la producción a gran escala, se ajustó el programa de sonicación para lograr lisar todas las células presentes y así liberar efectivamente la proteína de interés al medio de cultivo. Como se explicó en el apartado de introducción, los nanoanticuerpos son producidos en el periplasma bacteriano dentro de un entorno reductor (debido a una señal de localización presente en el constructo), por lo cual es necesario liberar el contenido intracelular a modo de recuperar la mayor cantidad de proteína posible.

Luego, al igual que en los casos anteriores, se corrió un gel de poliacrilamida *SDS-Page* 15% con los sonicados de los matraces (Ver metodologías sección 3.2.1.3) (Ver Fig. 21).

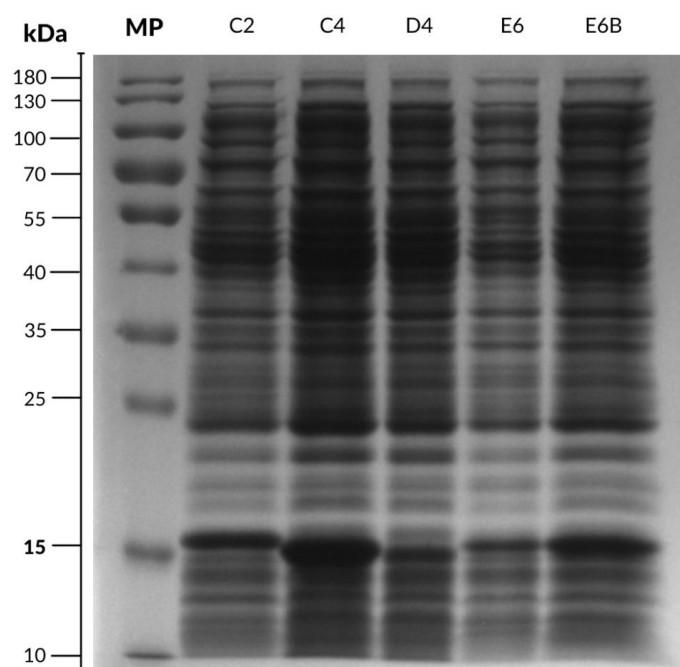


Fig. 21. Análisis mediante electroforesis *SDS-Page* de la expresión de los nanoanticuerpos α -hTL1A con una inducción de 5 hrs a 37°C con 400 μ M de IPTG y 750 μ M de ramnosa en matraces de 1L. Carril MP: *PageRuler™ Prestained Protein Ladder*, carril C2: nanoanticuerpo α -hTL1A C2, carril C4: nanoanticuerpo α -hTL1A C4, carril D4: nanoanticuerpo α -hTL1A D4, carril E6: nanoanticuerpo α -hTL1A E6, carril E6B: nanoanticuerpo α -hTL1A E6B.

Se observan bandas de expresión cerca de los 15 kDa correspondientes a cada uno de los nanoanticuerpos escalados. A continuación, y se purificaron los sobrenadantes sonicados para obtener únicamente nuestra proteína de interés.

Se procedió a purificar las proteínas por *FPLC-IMAC*. (Ver Fig. 22.) Se puede observar un cromatograma tipo para el método de cromatografía empleado. Se denota el primer “pico” sostenido en forma de meseta, correspondiente al pasaje del percolado (fracción no unida). Luego continúan las etapas de lavado en donde se obtiene un pico muy pequeño, correspondiente a impurezas.

Por último, se puede observar un gran pico de elución de los nanoanticuerpos de interés, en un pequeño volumen eluido, lo que redunda en una mayor concentración final respecto a la fracción de partida.

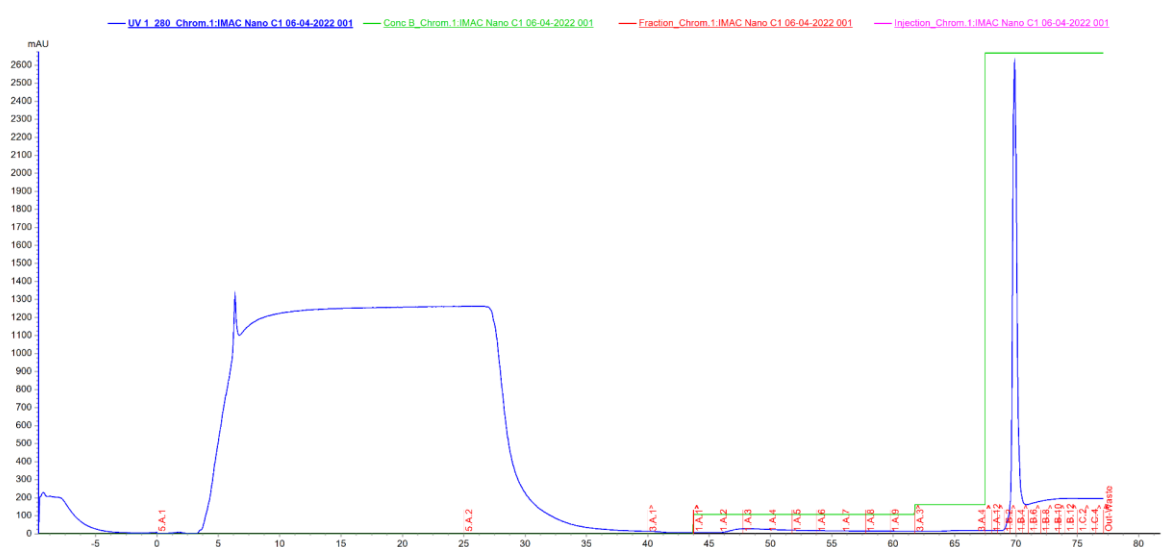


Fig. 22. Cromatograma obtenido mediante el software Unicorn 7.0 a partir de la purificación del V_HH C1 mediante FPLC-IMAC en el equipo ÄKTA Avant™. En el eje de las abscisas se representa el volumen de las fracciones en mL, y en el eje de las ordenadas se representa el valor de absorbancia en mUA. El gráfico en color azul representa la absorbancia a 280 nm, la línea de color verde representa el porcentaje de buffer B, y en color rojo se indica el nombre de cada fracción colectada.

Una vez recolectadas las fracciones de interés, las mismas fueron cargadas en un gel de poliacrilamida *SDS-Page* 15% con el objetivo de realizar un análisis del proceso de purificación completo, pudiendo realizar un seguimiento de la proteína de interés durante todo el proceso y visualizando la obtención de la pureza final y las pérdidas durante cada fracción. (Ver Fig. 23.)

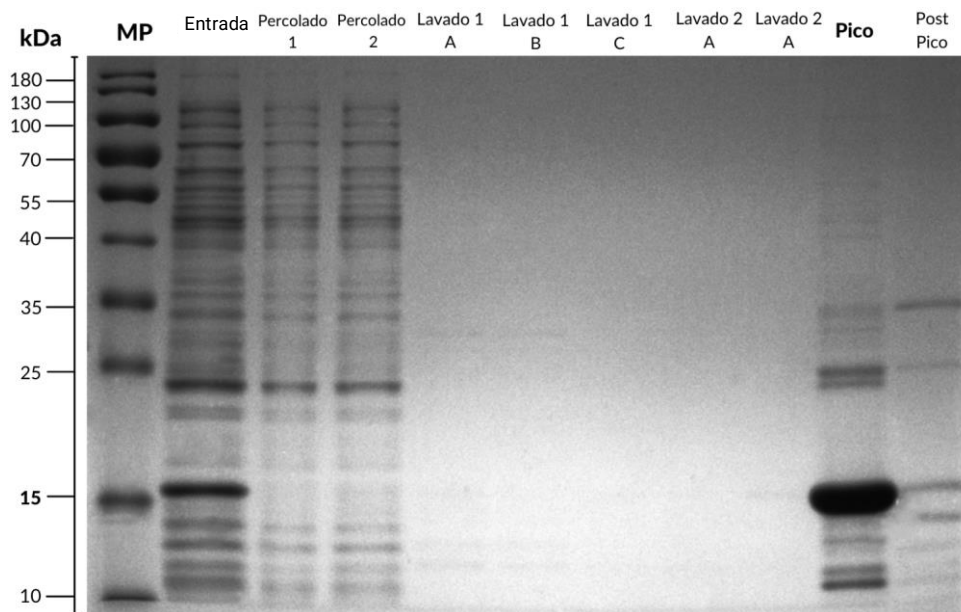


Fig. 23. Análisis mediante electroforesis *SDS-Page* del proceso de purificación del nanoanticuerpo C1 α -hTL1A con una inducción de 5 hrs a 37°C con 400 μ M de IPTG y 750 μ M de ramnosa. Carril MP: *PageRuler™ Prestained Protein Ladder*, carril Entrada: fracción “entrada” del proceso de purificación, carril Percolado 1: fracción percolado 1, carril Percolado 2: fracción percolado 2, carril Lavado 1 A: fracción 1 lavado 4% buffer B, carril Lavado 1 B: fracción 2 lavado 4% buffer B, carril Lavado 1 C: fracción 3 lavado 4% buffer B, carril Lavado 2 A: fracción 1 lavado 6% buffer B, carril Lavado 2 A: fracción 2 lavado 6% buffer B, carril Pico: fracción “pico” de nuestra proteína de interés, carril Post Pico: fracción “post pico”.

Como se observa en la figura (Ver Fig. 23.), se aprecia una banda nítida a la altura de 15 kDa, presente en la solución de entrada a la columna, que no es observada durante el pasaje del percolado, sugiriendo que queda retenida en la matriz de níquel. Sin embargo, si son observadas el resto de las proteínas presentes en el sonicado bacteriano soluble, las cuales al no presentar un *tag* de afinidad no se adsorben.

En el gel no se observan bandas en los lavados de la columna, (Ver Fig. 23.), por lo que consideramos en futuros experimentos rever los pasos de lavado, reduciendo su tiempo, aumentando las concentraciones de imidazol, o quitando algunas etapas de lavado, ya que no demuestran una ventaja significativa y hacen más largo el proceso global de purificación.

Por otro lado, se puede ver que, frente al agregado de una solución de imidazol a 500 mM, se eluyó la proteína de interés de forma exitosa, obteniendo una gran banda a la altura de

15 kDa (carril 10). Si bien la pureza no es del 100%, debido a pequeñas proteínas contaminantes (de mayor y menor peso molecular), sí es mayor al 90% (analizado por densitometría), suficiente para las aplicaciones de esta tesis.

Finalmente se observa que, frente a la continuación en el agregado de imidazol, así como en lavados posteriores de la columna, el porcentaje de proteína no eluida tiende a ser bajo, garantizando mínimas pérdidas asociadas al proceso.

Una vez se obtuvo la fracción del nanoanticuerpo, se dializó, con el objetivo de eliminar el Imidazol y cambiar el buffer de la solución y se cuantificó cada uno mediante absorbancia 280 nm utilizando el equipo *Infinite[®] M200 PRO NanoQuant (Tecan)* (Ver metodologías sección 3.2.1.19.2).

Finalmente se realizó un gel de poliacrilamida 15% *SDS-Page* donde se cargó 2.5 ug de cada nanoanticuerpo purificado y dializado, para luego calcular la pureza de los mismos. Para esto se utilizó el *software Fiji-ImageJ[®] (Image Processing and Analysis in Java)*. (Ver Fig. 24.)

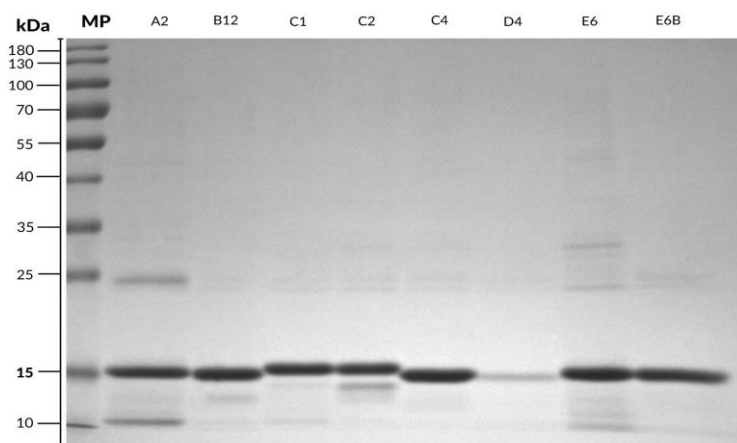


Fig. 24. Análisis mediante electroforesis *SDS-Page* de los nanoanticuerpos α -hTL1A purificados y dializados. Carril MP: *PageRulerTM Prestained Protein Ladder*, carril A2: nanoanticuerpo α -hTL1A A2, carril B12: nanoanticuerpo α -hTL1A B12, carril C1: nanoanticuerpo α -hTL1A C1, carril C2: nanoanticuerpo α -hTL1A C2, carril C4: nanoanticuerpo α -hTL1A C4, carril D4: nanoanticuerpo α -hTL1A D4, carril E6: nanoanticuerpo α -hTL1A E6, carril E6B: nanoanticuerpo α -hTL1A E6B

Se obtuvieron diferentes datos de concentraciones y purezas de cada nanoanticuerpo, los cuales se encuentran representados en la siguiente tabla. (Ver Tabla. 12.). La pureza se mantuvo mayor al 90% en la mayoría de los casos, excepto en C2, D4 y E6, para los cuales fue menor. Dicha tendencia coincide también con aquellos que presentaron la menor concentración.

Tabla. 12. Concentración y pureza de los nanoanticuerpos α -hTL1A escalados, purificados y dializados.

Nanoanticuerpo	Concentración (mg/mL)	Pureza (%)
A2	9.2	81
B12	5.0	95
C1	2.1	95
C2	0.5	78
C4	4.5	94
D4	0.1	89
E6	0.6	82
E6B	0.5	90

4.1.3. Optimización de la expresión, inducción y purificación de la proteína hTL1A en sistemas procariotas

Debido a que la proteína hTL1A comercial que se tenía a disposición se encontraba degradada, se decidió expresarla *in-house* en el mismo sistema procariota que se utilizó para la producción de los nanoanticuerpos (*Lemo21*(DE3)).

Para esto se partió de un plásmido pET28a+ codificante para hTL1A soluble, se variaron las condiciones de producción como el tiempo y temperatura de inducción (5 hrs a 37°C y 16-24 hrs a 25°C), la concentración de IPTG (0, 400, 700 y 1000 μ M) y la concentración de ramnosa en cultivo (0, 250, 750, 2000 μ M). Se realizaron cultivos a pequeña escala para evaluar las condiciones óptimas (Ver metodologías sección 3.2.1.16).

Una vez pasado el tiempo de inducción, se recolectó cada cultivo, y el *pellet* se sonicó. Luego se corrió un gel de poliacrilamida con dichos sonicados (Ver metodologías sección 3.2.1.3). (Ver Fig. 25)

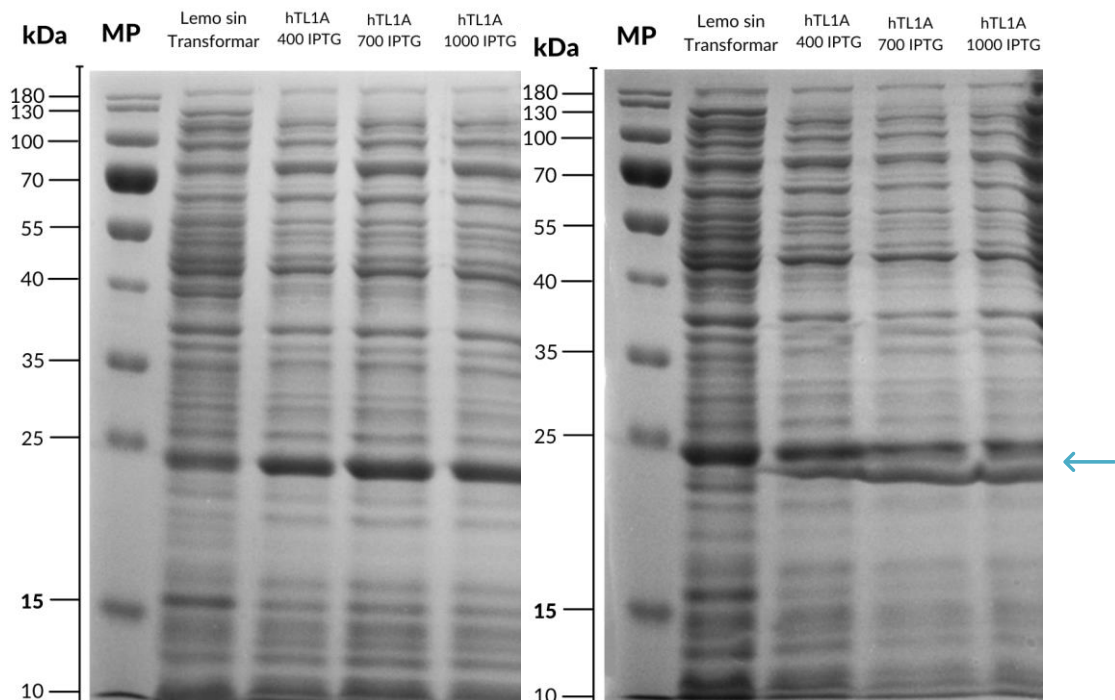


Fig. 25. Análisis mediante electroforesis *SDS-Page* de la expresión de la proteína hTL1A. A la izquierda se realizó mediante una inducción 16-24 hrs a 25°C y a la derecha una inducción de 5 hrs a 37 °C. Carril MP: *PageRuler™ Prestained Protein Ladder*, carril Lemo Sin Transformar: Lemo21(DE3) sin transformar, carril Htl1a 400 IPTG: hTL1A inducida con 400 μ M de IPTG, carril Htl1a 700 IPTG: hTL1A inducida con 700 μ M de IPTG, carril hTL1A 1000 IPTG: hTL1A inducida con 1000 μ M de IPTG. A la derecha las mismas condiciones a 37 °C por 5 horas.

Al analizar los resultados de la electroforesis, se puede observar una mayor intensidad de banda cerca de 21 kDa (peso de la proteína hTL1A soluble) utilizando 700 μ M de IPTG a 25 °C con una inducción 16-24 hrs, frente a la inducción de 5 hrs a 37 °C. Esto es consistente con lo reportado en bibliografía, ya que hTL1A es una proteína poco estable en solución, con tendencia a agregar en cuerpos de inclusión. Realizar la inducción a 25°C (reduciendo la energía cinética del medio, enlenteciendo el proceso) durante un tiempo extendido, facilita al correcto plegamiento por parte del mecanismo celular bacteriano. A 37 °C la cinética de la reacción es mayor, llevando a que la mayoría de la proteína producida pierda su conformación y se agregue de manera irreversible en cuerpos de inclusión (analizado por electroforesis, no mostrado).

Otro dato importante para resaltar es que al realizar un control de la cepa *Lemo21(DE3)* sin transformar se observa una banda propia de la misma a la altura donde debería estar la proteína de interés, hTL1A (21 kDa) (Ver Fig. 26), por lo tanto, no se puede determinar

exactamente si las bandas que observamos inicialmente se trata de hTL1A o de la proteína propia de la cepa *Lemo21*(DE3).

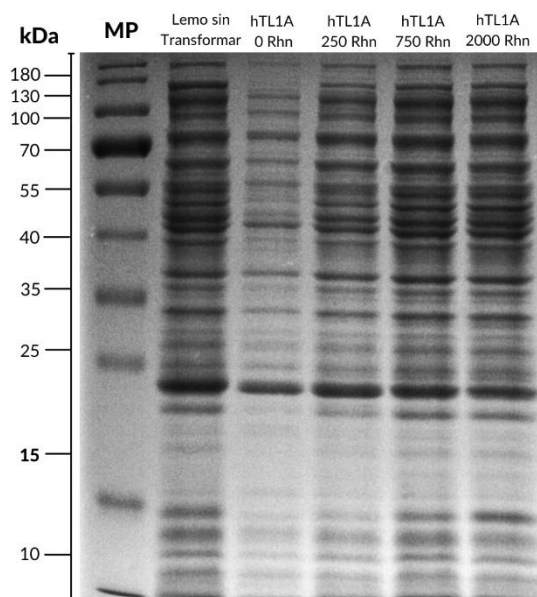


Fig. 26. Análisis mediante electroforesis *SDS-Page* de la expresión de la proteína hTL1A mediante una inducción 16-24 hrs a 25°C con 400 μ M de IPTG. Carril MP: *PageRulerTM Prestained Protein Ladder*, carril Lemo sin transformar: lisado de la proteína *Lemo21*(DE3) sin transformar, carril hTL1A 0 Rhn: proteína hTL1A con 0 μ M de ramnosa, carril hTL1A 250 Rhn: proteína hTL1A con 250 μ M de ramnosa, carril hTL1A 750 Rhn: proteína hTL1A con 750 μ M de ramnosa, carril hTL1A 2000 Rhn: proteína hTL1A con 2000 μ M de ramnosa.

Con el objetivo de evaluar la identidad de la proteína hTL1A de forma específica, se decidió llevar a cabo un *Western Blot* utilizando un monoclonal anti-TL1A (Ver metodologías sección 3.2.1.20) para lo cual se sembró un sonicado de bacterias *Lemo21*(DE3) sin transformar en un pocillo, y en el resto se sembraron sonicados de un cultivo de bacterias transformadas con el péptido codificante para hTL1A, que habían sido cultivadas con distintas concentraciones de ramnosa (0, 250, 750 y 2000 mM) e inducidas con una concentración fija de IPTG. (Ver Fig. 26). Los resultados de *western* se muestran en la siguiente figura (Ver Fig. 27).

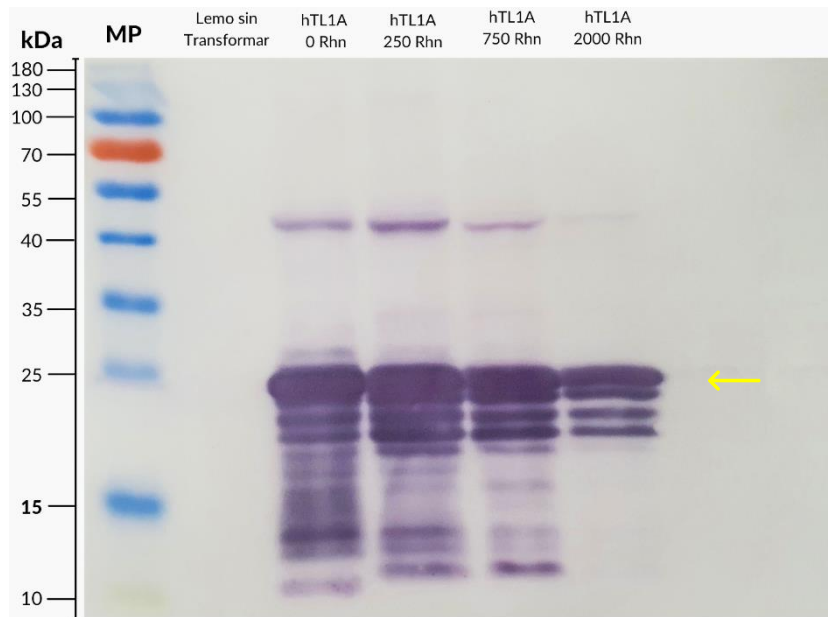


Fig. 27. Análisis mediante *Western Blot* de la expresión de la proteína hTL1A mediante una inducción 16-24 hrs a 25°C con 400 μM de IPTG. Carril MP: *PageRuler™ Prestained Protein Ladder*, carril Lemo sin transformar: lisado de la proteína *Lemo21(DE3)* sin transformar, carril hTL1A 0 Rhn: proteína hTL1A con 0 μM de ramnosa, carril hTL1A 250 Rhn: proteína hTL1A con 250 μM de ramnosa, carril hTL1A 750 Rhn: proteína hTL1A con 750 μM de ramnosa, carril hTL1A 2000 Rhn: proteína hTL1A con 2000 μM de ramnosa.

Al analizar el resultado del *Western Blot*, se puede observar únicamente bandas de hTL1A en los carriles de *Lemo21(DE3)* transformada con el plásmido de expresión de hTL1A (carril 3-6), mientras que en el control sin transformar (carril 2) no se observó ninguna banda. Dicho resultado confirma la correcta expresión de hTL1A en las condiciones testadas.

Si bien el *Western blot* no es una técnica cuantitativa, se pueden observar diferencias de expresión a grandes rasgos comparando las intensidades de las bandas obtenidas bajo diferentes condiciones de cultivo. En este sentido, se observaron intensidades de banda muy similares entre las diferentes condiciones de ramnosa (0, 250, 750 y 2000 μM), por lo tanto, se decidió no adicionar ramnosa en futuras producciones.

Por otro lado, también se observaron bandas de menor peso molecular, que podrían corresponder a polipéptidos de TL1A que no llegaron a completar su traducción proveniente del citoplasma celular. También se observa una banda de mayor peso molecular, que coincide con el peso de un trímero de TL1A. En solución TL1A forma

naturalmente estos trímeros, por lo que es posible que las condiciones desnaturalizantes del gel no hayan sido totalmente efectivas como para deshacer esos trímeros completamente.

Finalmente, tomando en cuenta los resultados de los geles y del *Western Blot*, se eligieron las mejores condiciones de expresión: inducción a 25 °C 16-24 hrs, 400 μ M de IPTG y 0 μ M de ramnosa.

4.1.4. Producción de hTL1A a escala de matraces 250 mL

Una vez establecidas las condiciones óptimas de expresión de la proteína hTL1A, se procedió a realizar el escalado de la misma forma que se realizó con los nanoanticuerpos. Para ello, se inocularon 250 mL de medio de cultivo con una proporción 1/50 de precultivo y se indujo la expresión con 400 μ M de IPTG, 16-24 hrs a 25 °C.

Luego de terminar la producción a gran escala, se ajustó el programa de sonicación para lograr lisar todas las células presentes y así liberar efectivamente la proteína de interés al medio de cultivo. Una vez obtenido el sonicado, se centrifugó a máxima velocidad, 4 °C, durante 20 minutos y se preparó la muestra para purificar por FPLC IMAC utilizando columnas Ni-NTA que retendrán a hTL1A (ya que se expresa fusionada a una cola de 6xHis). (Ver. Fig. 28)

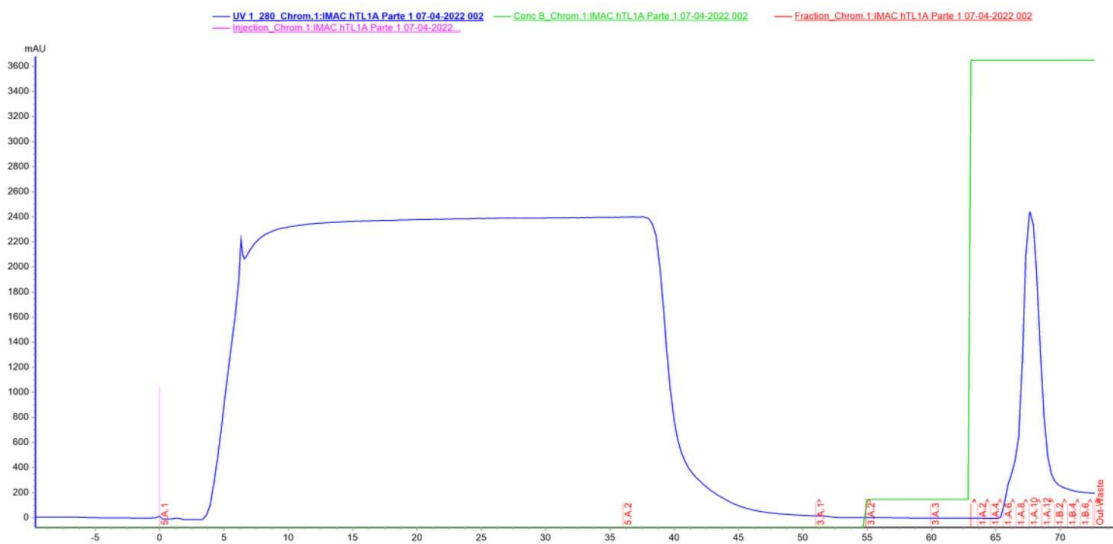


Fig. 28. Cromatograma obtenido mediante el software Unicorn 7.0 a partir de la purificación hTL1A mediante FPLC-IMAC en el equipo ÄKTA Avant™. En el eje de las abscisas se representa el volumen de las fracciones en mL, y en el eje de las ordenadas se representa el valor de absorbancia en mUA. El gráfico en color azul representa la absorbancia a 280 nm, la línea de color verde representa el porcentaje de buffer B, y en color rojo se indica el nombre de cada fracción colectada.

Una vez recolectadas las fracciones de interés, se cargaron en un gel de poliacrilamida *SDS-Page* 15% con el objetivo de analizar el proceso de purificación completo y evaluar la pureza de nuestra proteína de interés. (Ver Fig. 29.)

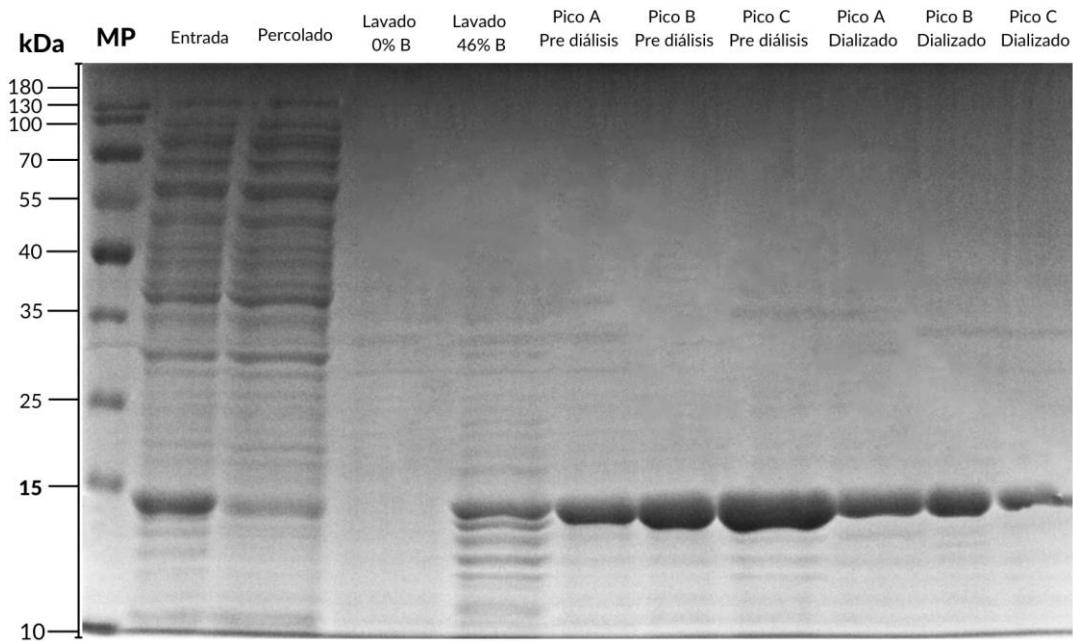


Fig. 29. Análisis mediante electroforesis *SDS-Page* del proceso de purificación de la proteína hTL1A con una inducción de 16-24 hrs a 25 °C con 400 μ M de IPTG y 0 μ M de ramnosa. Carril MP: *PageRuler™ Prestained Protein Ladder*, carril Entrada: fracción “entrada” del proceso de purificación,, carril Percolado: fracción percolado 1 y 2, carril Lavado 0% B: fracción lavado 0% buffer B, carril Lavado 46%: fracción lavado 46% buffer B, carril Pico A pre diálisis: fracción A del “pico” de hTL1A predializado, carril Pico B Pre diálisis: fracción B del “pico” de hTL1A predializado, carril Pico C Pre diálisis: fracción C del “pico” de hTL1A predializado, carril Pico A dializado: fracción A del “pico” dializado de hTL1A, carril Pico B dializado: fracción B del “pico” dializado de hTL1A, carril Pico C dializado:fracción C del “pico” dializado de hTL1A.

En la figura anterior, se puede observar el proceso de purificación de la proteína hTL1A, y sus correspondientes fracciones de elución. En este caso, se fraccionó el eluido proteico obtenido en la purificación en tres fracciones diferentes para su mejor manejo: “Pico A”, “Pico B” y “Pico C”. Se puede observar una banda nítida a la altura de 21 kDa en el eluido que realizamos con 500 mM de Imidazol (carriles “pico”) lo que indica la presencia de la proteína hTL1A purificada.

Una vez se obtuvo la fracción de hTL1A, se dializó para poder utilizar en ensayos de *ELISA* e *in vitro*. Se cuantificó cada uno mediante absorbancia 280 nm utilizando el equipo *Infinite® M200 PRO NanoQuant (Tecan)* (ver metodología sección 3.2.1.10.2). (Ver Tabla. 13.)

Tabla. 13. Concentración y pureza de las fracciones de la proteína α -hTL1A escaladas, purificadas y dializadas.

Concentración (mg/mL)	Pureza (%)
A: 1.260	98
B: 1.580	96
C: 0.102	95

Se obtuvieron purezas en todos los casos mayores a 90% y concentraciones que rondan el mg/mL. Se decidió utilizar la fracción más concentrada en los ensayos que se describirán de aquí en más (fracción B).

4.1.5. Reconocimiento de hTL1A con nanoanticuerpos purificados

Una vez que la proteína hTL1A y los nanoanticuerpos α -hTL1A estuvieron purificados, dializados y cuantificados, se corroboró el reconocimiento de los nanoanticuerpos por hTL1A mediante *ELISA*.

Con este fin, se tapizaron pocillos con 3 proteínas TL1A solubles de distintos orígenes (comercial, *in-house* y fusionada a *Fc*), tras lo cual se incubaron los diferentes nanoanticuerpos, relevando la unión con un anticuerpo anti-HA-HRP (los nanoanticuerpos se expresan fusionados a un epítipo HA para su detección). (Ver Fig. 30)

Tanto TL1A comercial como *in-house* fueron producidas en sistemas procariotas, y por tanto carecen de modificaciones post-traduccionales. La fusión hTL1A-*Fc* se produjo en sistemas eucariotas (HEK), que realizan las correspondientes modificaciones post-traduccionales, y se utilizó buscando una versión con mayor similitud estructural a la presente en el cuerpo humano.

Por otro lado, la fusión a un *Fc* confiere a la proteína la capacidad de estabilizarse en su adsorción a la placa de *ELISA*. El dominio de unión de TL1A tanto a su receptor como a los paratopes de los nanoanticuerpos, logra así una exposición más cercana a la presentada en membranas celulares.

En todos los casos utilizaron concentraciones de 1 $\mu\text{g}/\text{mL}$ de hTL1A y 1 $\mu\text{g}/\text{mL}$ de nanoanticuerpos anti-hTL1A según el procedimiento descrito en metodologías (Ver metodologías sección 3.2.1.9)

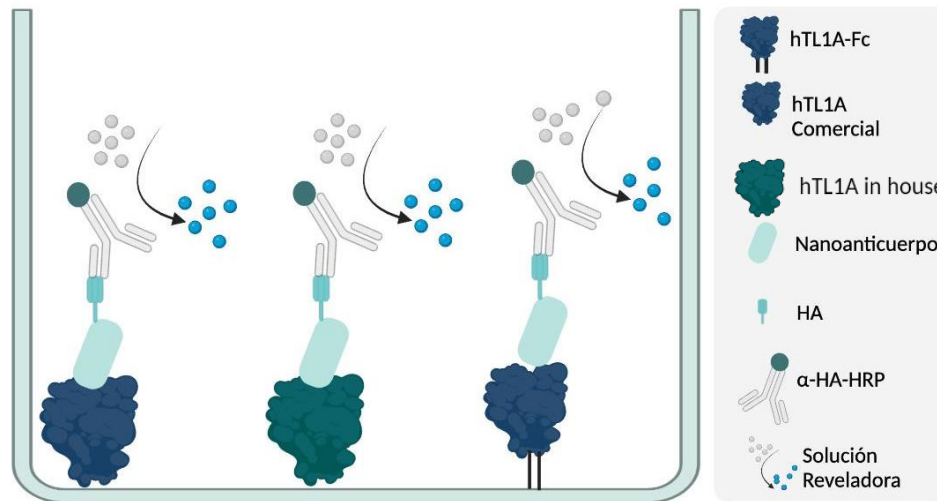


Fig. 30. Modelo esquemático de *ELISAs* de unión de la proteína hTL1A - nanoanticuerpos (fusionados a un tag HA). Se representa de izquierda a derecha: *ELISA* sensibilizando con hTL1A comercial producida en *E. coli*, a la cual se le adsorbe un nanoanticuerpo conteniendo un tag de fusión HA, el revelado se realiza mediante el agregado de un anticuerpo monoclonal anti-HA conjugado a peroxidasa. Siguiendo, se representa el mismo tipo de ensayo, pero sustituyendo la proteína por hTL1A producida en *E. coli. in house*. Finalmente se representa el diagrama de *ELISA* sustituyendo la proteína por su versión fusionada a Fc, permitiendo una mejor adsorción a la placa, manteniendo una mejor conformación tridimensional y exposición de epítopes reconocibles por los nanoanticuerpos producidos.

En el caso de los pocillos sensibilizados con hTL1A comercial la señal obtenida es menor a 0.1 UA para todos los clones, mientras que se observan señales mayores a 1 UA al utilizar las otras dos proteínas de *coating*, lo que sugiere que la proteína comercial no estaba bien conservada (analizado por SDS-PAGE, no mostrado), y que los nanoanticuerpos producidos presentan un buen reconocimiento por su antígeno. (Ver Fig. 31.)

El control de especificidad se llevó a cabo tapizando pocillos con la proteína de bloqueo (BSA) solamente. Los niveles de señal en estos casos se mantuvieron esperablemente bajos, menor a 0.1 UA. Por lo tanto, la relación entre *background* y señal de interés es lo

suficientemente distante como para validar la correcta especificidad de los nanoanticuerpos.

Por último, en todos los casos, el control negativo utilizado (un nanoanticuerpo sin especificidad por hTL1A) presentó una muy baja señal (*background* del ensayo), frente a las diferentes versiones de TL1A y a BSA, lo que valida el resto de los resultados.

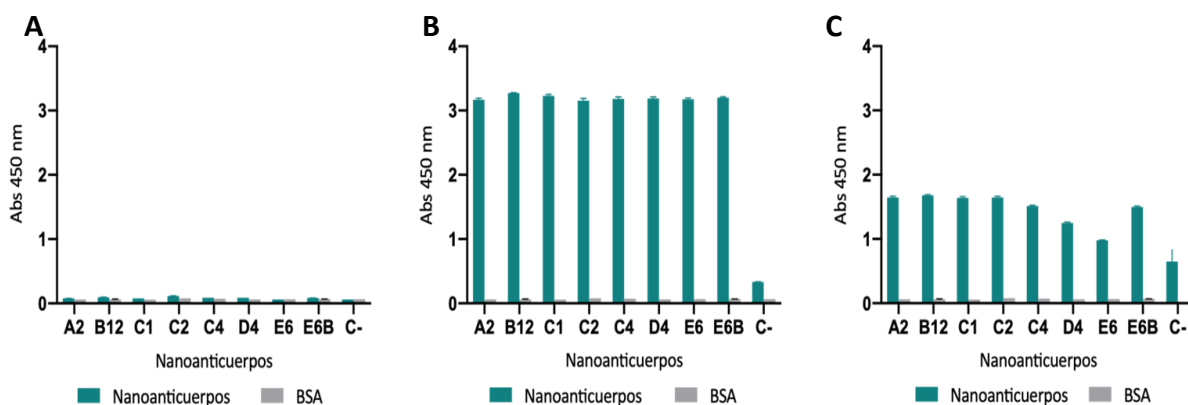


Fig. 31. Diferentes técnicas de *ELISA* llevadas a cabo para analizar el reconocimiento de los nanoanticuerpos producidos por su molécula *target* hTL1A. De izquierda a derecha: A: *ELISA* de reconocimiento utilizando hTL1A comercial producida en *E. coli*, B: *ELISA* de reconocimiento utilizando hTL1A producida *in-house*, C: *ELISA* de reconocimiento utilizando hTL1A-Fc, comercial producida en células HEK-293.

La mayor absorbancia observada en los pocillos incubados con hTL1A *in house* respecto a hTL1A-Fc puede ser explicada porque en el coating se utilizó la misma concentración proteica, lo que equivale a un número de moles de TL1A de 2,2 veces menor en el caso de la fusión a Fc. También podría deberse a la presencia de modificaciones postraduccionales en esta última versión, que impidiera la unión parcial de los nanoanticuerpos a TL1A, aunque esto es poco probable que suceda con todas las secuencias de nanoanticuerpos que tienen paratopes diferentes.

A partir de estos resultados, se decidió realizar los futuros ensayos de reconocimiento utilizando la versión de hTL1A-Fc comercial producida en células de mamífero, a modo de acercarnos más a la realidad mostrada en el cuerpo humano.

4.1.6. Interacción hTL1A y su receptor hDR3 en formato de *ELISA*

Una vez evaluada la unión de hTL1A con los nanoanticuerpos, se llevó a cabo un ensayo de interacción con su receptor hDR3 mediante la técnica de *ELISA*. Este ensayo tiene como objetivo poner a punto la unión ligando-receptor a modo de generar un ensayo para evaluar la de inhibición de la interacción (al adicionar los nanoanticuerpos producidos en esta tesis).

Se pusieron a punto dos tipos de ensayos de *ELISA* (Ver Fig. 32.) intentando evaluar las mejores condiciones de visualización de la unión molecular *in-vitro*. En una primera instancia se evaluó la unión de hDR3-*Fc* a la molécula de hTL1A (versiones de *E.coli*, comercial e *in-house*) sensibilizada en placa de *ELISA*, realizando el revelado con un anti-*Fc* conjugado a peroxidasa.

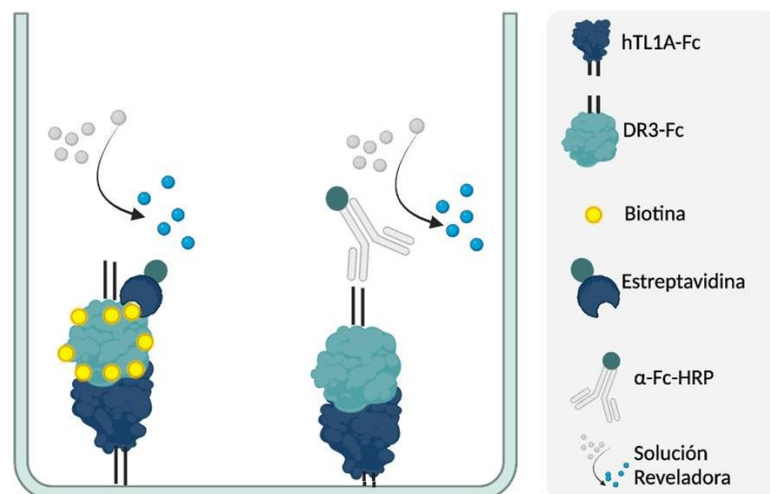


Fig. 32. Diferentes técnicas de *ELISA* de unión llevadas a cabo. De izquierda a derecha: Utilizando hDR3 biotinilado, utilizando hDR3-*Fc*. Los revelados se realizaron utilizando estreptavidina peroxidasa o anti-*Fc* HRP, respectivamente.

Se probaron diferentes concentraciones de *coating* de hTL1A: 5 $\mu\text{g/mL}$ para ambas variedades (hTL1A *E. coli* comercial e *in-house*), y 10 $\mu\text{g/mL}$ para la producida *in-house*. Posteriormente, se adicionaron concentraciones decrecientes de hDR3 partiendo de 10 $\mu\text{g/mL}$ hasta 0 $\mu\text{g/mL}$ (modelo de *checkerboard*). El anti-*Fc* utilizado se diluyó 1/10000 de acuerdo con el fabricante.

Los resultados muestran (Ver Fig. 33.) las condiciones de concentración de *coating* 10 $\mu\text{g}/\text{mL}$ (TL1A producida en *E. coli*) y 10 $\mu\text{g}/\text{mL}$ de hDR3-Fc, alcanzaron los mayores valores de absorbancia (aproximadamente 1.8 UA). Debido a que dicho ensayo deberá ser repetido considerables veces para analizar los clones de nanoanticuerpos inhibidores, rápidamente descartamos las concentraciones de 10 $\mu\text{g}/\text{mL}$ para uso de *screening* debido al gasto de reactivos costosos (proteínas recombinantes).

La siguiente concentración (5 $\mu\text{g}/\text{mL}$), de ambos reactivos no presenta una diferencia marcada en la bajada de absorbancia, por lo que se considera la elección más razonable en este caso. Bajadas subsiguientes de concentración (2,5 $\mu\text{g}/\text{mL}$) comienzan a disminuir la señal de unión a niveles no deseados (menor a 1 UA) los cuales dificultarían la interpretación frente al agregado de un agente inhibitorio (*nanobody*). Por otro lado, evaluando el *background* en ausencia de hDR3-Fc, se puede ver que resulta aceptable en relación con la señal de interés.

Finalmente, en cuanto a las diferencias entre la hTL1A comercial y producida *in-house*, podemos observar que la diferencia de señal es muy marcada. Esto es coherente con los resultados anteriores, ya que la obtenida de forma comercial no se encontraba en condiciones óptimas para favorecer la unión de los nanoanticuerpos. Es posible que se encuentre desnaturalizada o con cambios conformacionales relevantes, impidiendo la unión.

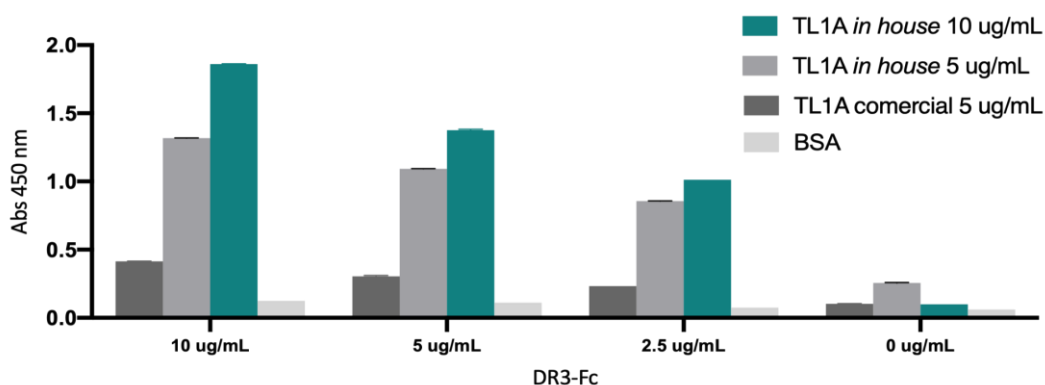


Fig. 33. ELISA de puesta a punto de la unión de hTL1A y su receptor hDR3. Se analizaron las concentraciones de hTL1A sensibilizado en placa de 10 y 5 $\mu\text{g}/\text{mL}$, tanto en su versión producida *in-house* como su versión comercial. Ambas producidas en procariotas. Se agregaron luego concentraciones decrecientes de hDR3 (10, 5, 2.5 y 0 $\mu\text{g}/\text{mL}$) para evaluar la relación entre señal /*background*.

En la segunda instancia, y a modo de poder utilizar una versión de hTL1A producida en eucariotas fusionada a Fc, con las ventajas antes expuestas, se realizó un cambio en el formato del ensayo de *ELISA* propuesto anteriormente. Se sustituyó para ello a hDR3 por una versión biotinilada la cual se reveló por el agregado de estreptavidina peroxidasa.

Este cambio, tiene como consecuencia el no poder revelar la unión con un anti-Fc-HRP, por lo que se sustituyó a hDR3, por una versión biotinilada la cual se reveló por el agregado de estreptavidina peroxidasa.

El complejo biotina-estreptavidina presenta una avidéz de unión elevada (de las más grandes en la naturaleza), y permite la posibilidad de realizar una amplificación de la señal, ya que existen varias moléculas de biotinas por molécula de hTL1A, lo que habilita la posibilidad de la unión de varias estreptavidinas conjugadas a peroxidasa por molécula, derivando en una amplificación de la señal. Además, la estreptavidina adquirida está conjugada a una cadena de varias HRP por molécula, lo que genera una amplificación aún mayor de la señal.

Al igual que en el caso anterior, se pusieron a punto las concentraciones óptimas para la unión, se utilizó un esquema de *checkerboard* en donde se utilizaron concentraciones decrecientes a partir de 10 µg/mL hasta 0 µg/mL, tanto de hTL1A estabilizada en placa (*coating*) así como de hDR3 Biotinilado. El revelado se realizó con estreptavidina peroxidasa a una dilución de 1/16000 y todas las soluciones fueron realizadas PBS-1X - 0,05% Tween® 20. (Ver Fig. 34.).

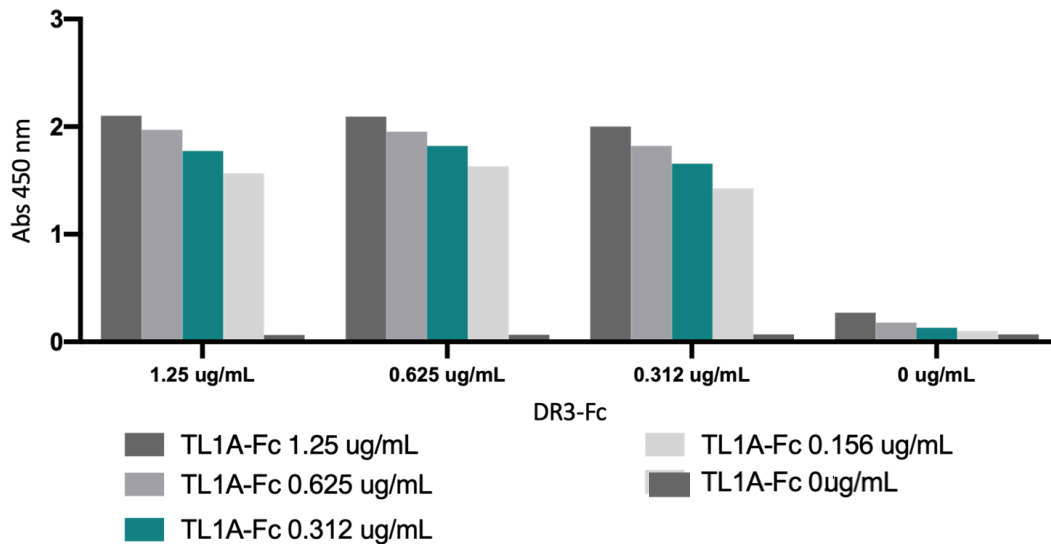


Fig. 34. *ELISA* de puesta a punto de la unión de hTL1A y su receptor hDR3 en su versión biotinilada. Se probaron concentraciones decrecientes de DR3-Fc y TL1A en formato de *checkerboard*, partiendo de 1.25 $\mu\text{g/mL}$ y llegando a 0 $\mu\text{g/mL}$.

Los resultados muestran que existen variaciones menores a 0,1 UA en las señales máximas alcanzadas dependientes de la concentración de hTL1A sensibilizadas en la placa. Existe una reducción de aproximadamente 0.2 UA al disminuir la concentración a la mitad. Por otro lado, disminuciones en la concentración de DR3 Biotinilado, no presentan una consecuencia marcada en la señal (alrededor de 2 UA).

Dado que las absorbancias entre una concentración de hTL1A de 1.25 $\mu\text{g/mL}$ y 0.625 $\mu\text{g/mL}$ no presentan diferencias mayores a 0,5 UA, se eligieron finalmente las siguientes concentraciones para los futuros ensayos de inhibición: 0.6 $\mu\text{g/mL}$ de hTL1A reaccionando y 0.6 $\mu\text{g/mL}$ de hDR3-Biotinilado.

Finalmente, comparando entre formatos de *ELISA*, se observa que la utilización de hTL1A-Fc y DR3-Biotinilado generan señales mayores a 1 UA empleando concentraciones menores a 1 $\mu\text{g/mL}$, lo cual resulta en la opción más razonable y óptima para generar un modelo al cual adicionar nanoanticuerpos inhibidores. Es por ello, que de ahora en más se referirá a la los *ELISAS* de inhibición, como aquellos que utilizan dicho formato como base.

4.1.7. Inhibición de la interacción hTL1A y su receptor hDR3 en formato de ELISA

Una vez sentadas las bases para el ensayo de unión entre hTL1A y hDR3 en *ELISA*, confirmando que la unión se puede visualizar por esta metodología, se procedió a repetir dichos ensayos en presencia de nanoanticuerpos inhibidores.

Se realizaron un total de 3 ensayos de inhibición frente a la presencia de diferentes grupos de nanoanticuerpos: G1, G2 y G3. El grupo G1 refiere a los 8 nanoanticuerpos producidos y purificados en los capítulos anteriores, cuyas secuencias derivan de ensayos previos al comienzo de esta tesis.

El grupo G2, refiere a nanoanticuerpos generados por metodologías de *phage display*, a partir de la biblioteca de fagos, como se explicará en las siguientes secciones.

El grupo G3, corresponden a nanoanticuerpos generados por metodologías de *phage display*, similares al grupo G2, pero adicionando pasos de pre-adsorción y direccionamiento en su selección, favoreciendo la capacidad de unión al epítipo de hTL1A involucrado en su unión a DR3. (Ver metodologías 3.2.1.10).

4.1.7.1. Grupo G1

El primer grupo (G1) analizado muestra que (Ver Fig. 35.) ninguno de los nanoanticuerpos producidos y purificados (a una elevada concentración de 10 µg/mL) fueron capaces de generar una inhibición de la unión considerable. Al comparar las señales de absorbancia obtenidas en los pocillos a los que se agregaron nanoanticuerpos, frente al pocillo en el que no se agregó ningún nanoanticuerpo (denominado DR3-biot) y frente al pocillo en el que se agregó un nanoanticuerpo de especificidad irrelevante como control negativo de inhibición (C-), se observa que no hay diferencias significativas.

Sin embargo, los controles de inhibición utilizados, DR3-Fc “frío”, que compite por la unión a TL1A con DR3-Fc-biotinilado y un monoclonal comercial anti-TL1A neutralizante, sí logran generar una relativa reducción de la señal, aproximadamente de un 60% en el caso de DR3-Fc y de un 50% en el caso del anticuerpo monoclonal.

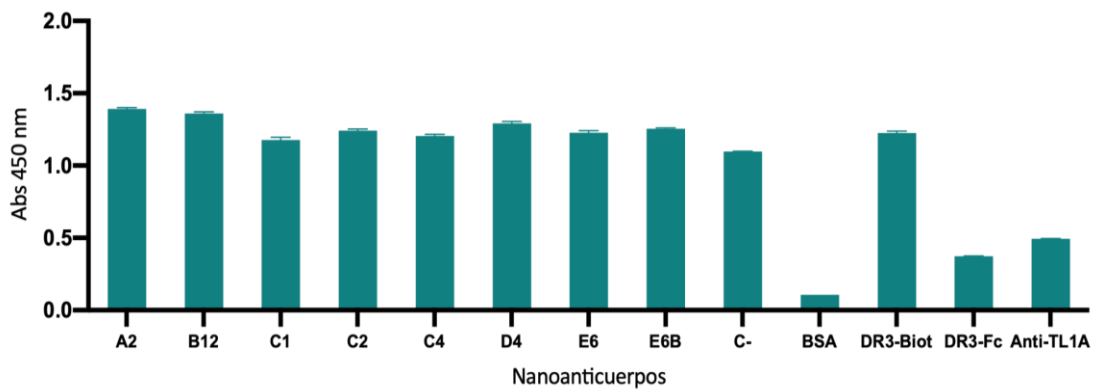


Fig. 35. Gráfico de barras representando la señal obtenida por la inhibición de la unión entre hTL1A y hDR3 frente al agregado de los 8 nanoanticuerpos del grupo G1. Se observa a la derecha los controles: “DR3-Biot”- Control positivo de unión, “DR3-Fc”- Control negativo de competencia, “Anti-TL1A”- Anticuerpo monoclonal inhibidor.

Existen dos hipótesis principales que pueden explicar que los nanoanticuerpos producidos y purificados no hayan logrado inhibir la unión ligando-receptor:

- a. Es probable que los epítopes reconocidos por los nanoanticuerpos no se encuentren en la zona unión de hTL1A con hDR3, por lo tanto, si bien son capaces de reconocer a TL1A en *ELISA*, no son capaces de desplazar la unión con su receptor DR3.
- b. Que la unión ligando-receptor entre hTL1A y hDR3 presente una mayor afinidad de unión que la obtenida por los nanoanticuerpos generados (*K_d*). Esta posibilidad es remota, ya que la *K_d* descrita para la interacción ligando-receptor no llega al rango nanomolar, y los anticuerpos anti-TL1A se seleccionaron a partir de una biblioteca proveniente de una llama inmunizada, cuyos plasmocitos pasaron por el fenómeno de maduración de la afinidad, lo que suele arrojar afinidades muy altas de anticuerpos por el antígeno. Además, durante el proceso de selección o *panning*, se llevaron a cabo estrategias específicas para obtener los nanoanticuerpos de mayor afinidad por TL1A, lo que se chequeó por *ELISA* según el método descrito anteriormente (Ver metodologías sección 3.2.1.9.)

4.1.8. Rondas de *Panning* contra hTL1A

4.1.8.1. Grupo G2

Debido a que los resultados anteriores no fueron los esperados (Nanos G1), se llevaron a cabo estrategias para generar nuevos clones de nanoanticuerpos mediante la tecnología de *phage display*. Como primera aproximación, se buscó obtener clones que reconocieran la versión de TL1A producida en sistemas eucariotas, con las modificaciones post-traduccionales pertinentes, que podrían influir en el sitio de unión al receptor.

Para ello se tomó una biblioteca de nanoanticuerpos clonados en vectores fagémidos previamente obtenida de una llama inmunizada con hTL1A (*in house*) en investigaciones previas, y se procedió a generar a partir de ella la biblioteca de fagos correspondiente. (Ver metodologías sección 3.2.1.24). Cabe destacar que dicha biblioteca de fagémidos se obtuvo tras haber realizado tres rondas de selección mediante *phage display*, con la misma proteína de inmunización, por lo que se encuentra parcialmente sesgada en su diversidad.

Con dicha biblioteca realizaron dos rondas de *panning* (Ver Tabla 14.), sensibilizando con hTL1A-Fc producido en células HEK, siguiendo la metodología habitual descrita (Ver metodologías 3.2.1.10.). A estos clones obtenidos se los denominó nanoanticuerpos G2. Mediante esta estrategia se espera obtener nanoanticuerpos que reconozcan la versión eucariota de TL1A.

Tabla. 14. Resultados de las rondas de *panning* de hTL1A-Fc del grupo G2.

Ronda	Coating	Input	Output	Ratio	Lavados	Clones Analizados	Reconocen	Inhiben
1	10 μg/mL	4.0x10 ¹²	7.0x10 ⁶	1.8x10 ⁻⁶	Permisivos	10	Si	No
2		4.1x10 ¹⁰	7.4x10 ⁷	1.8x10 ⁻³	5 rondas de 5 lavados	10	Si	No

Los resultados obtenidos muestran un título esperado de *outputs* tras la primera y segunda ronda (mayor a 10⁶-10⁷). El *ratio* (*output/input*) calculado aumentó tres órdenes, lo que sugiere un enriquecimiento en nanoanticuerpos específicos por TL1A-Fc. Se realizaron lavados más exigentes en la segunda ronda, a modo de seleccionar aquellos clones de mayor afinidad por la variante de hTL1A-Fc.

Se aislaron clones de cada output mediante infección de bacterias TG-1 y plaqueo en *LB* agar. Se cultivaron varias colonias conteniendo cada una, una secuencia de nanoanticuerpo determinada, y se indujo su expresión (fusionado a pIII) con IPTG durante toda la noche, en ausencia de fago helper. Según se explicó en la introducción, una porción del nanoanticuerpo sintetizado (fusionado a pIII y a un epítipo HA) se liberará al medio de cultivo al llegar el cultivo a estado estacionario. Con el sobrenadante de estos cultivos se realizó un ensayo de screening de estos clones, con el objetivo de evaluar su especificidad individualmente.

Todos los clones (del *output 2*, segunda ronda) resultaron positivos para el reconocimiento de hTL1A-Fc en *ELISA*, obteniendo niveles de absorbancia similares a los del grupo anterior (alrededor de 1 UA, Ver Fig. 36.).

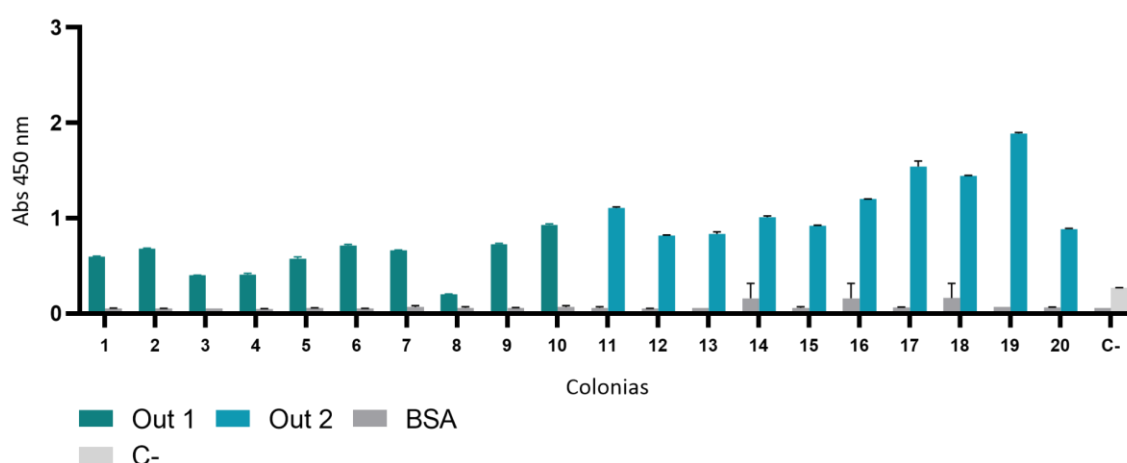


Fig. 36. Gráfico de barras representando la señal obtenida por de la unión entre hTL1A y los nanoanticuerpos seleccionados por *Phage Display*, grupo G2. Se representa el *output 1* (primera ronda) y el *output 2* (segunda ronda).

Asimismo, se sometieron a un *screening* de inhibición, analizando si efectivamente fueron capaces de ser seleccionados contra la zona de interacción entre hTL1A y hDR3. Lamentablemente, ninguno de los clones fue capaz de reducir la señal, similar a lo que se obtuvo con el grupo G1. (Ver Fig. 37.) Esto pudo deberse a que no conseguimos nanoanticuerpos que se unieran al sitio de unión de TL1A con DR3, o a que las concentraciones de nanoanticuerpos que se produjeron a partir del pComb3X no fueron suficientes para desplazar la señal arrojada por DR3-biot.

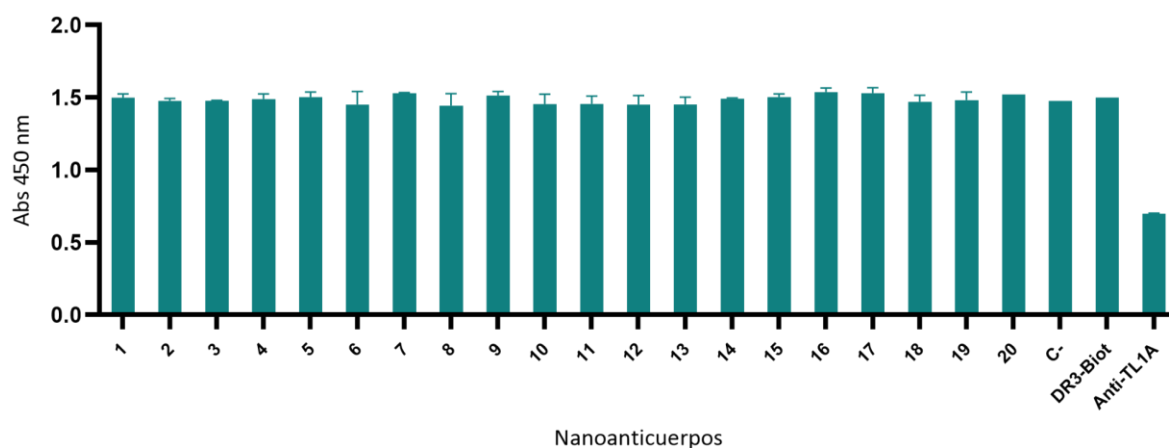


Fig. 37. Gráfico de barras representando la señal obtenida por la inhibición de la unión entre hTL1A y hDR3 frente al agregado de los nanoanticuerpos del grupo G2 (20 clones del *output* 2). Se observa a la derecha los controles: “DR3-Biot”- Control positivo de unión, y “Anti-TL1A”- Anticuerpo monoclonal inhibidor.

Sumado a esto surgió la incertidumbre de durante el proceso de selección utilizando la molécula de hTL1A-*Fc*, pudiesen haberse seleccionado nanoanticuerpos contra la región *Fc*, preferentes antes que el dominio estabilizado de hTL1A, algo para tener en cuenta, al probar nuevas estrategias.

Dichos clones fueron secuenciados posteriormente y todas las secuencias obtenidas coincidieron con algunas de los nanoanticuerpos que ya teníamos, indicando que la estrategia de selección de nuevos clones no fue eficaz.

4.1.8.2. Grupo G3

En un segundo esfuerzo por obtener clones que efectivamente se unieran epítopes distintos de TL1A, y por lo tanto aumentar la probabilidad de conseguir clones capaces de desplazar la unión en *ELISA*, se decidió modificar la estrategia de *panning* (Ver Fig. 38).

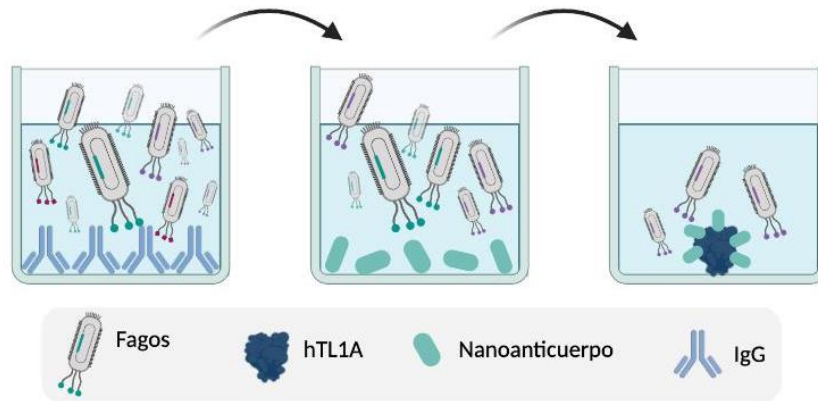


Fig. 38. Ilustración representando estrategia de pre-adsorción para la selección y direccionamiento de nuevos clones anti-hTL1A sin especificidad cruzada con *Fc* humano, autorreactividad, o epítopes previamente obtenidos. Se parte en una primera etapa de un *input* de fagos pre-adsorbiéndolos en una placa con IgG humano. Dicho *output* se incuba luego en un pocillo con un mix de nanoanticuerpos G1, para eliminar autorreactividad. Finalmente son enfrentados a un pocillo con hTL1A cubierto con un *mix* de nanoanticuerpos G1, siendo expuestos aquellos epítopes no obtenidos hasta el momento.

La estrategia utilizada está compuesta por tres aristas fundamentales que se detallan a continuación:

- a. Una pre-adsorción del *input* de la biblioteca de fagos frente a un pocillo sensibilizado con un anticuerpo IgG humano (a 10 $\mu\text{g}/\text{mL}$) por 30 minutos, para que queden retenidos aquellos que presenten especificidad por la zona *Fc* de la molécula de hTL1A-*Fc*.
- b. Los fagos no retenidos en el paso a son posteriormente incubados en un pocillo sensibilizado con un *mix* de nanoanticuerpos G1 (a 10 $\mu\text{g}/\text{mL}$ totales durante 30 minutos). Este paso se añade para eliminar todo posible clon que presente reactividad contra algún nanoanticuerpo del grupo G1. Este paso es fundamental para la estrategia. Nota: aunque no se espera que la llama originalmente haya

desarrollado anticuerpos específicos contra el *Fc* humano o estos nanoanticuerpos, puede suceder que se seleccionen mediante panning algunos clones de baja especificidad y afinidad (a los que denominamos “clones promiscuos”) que impidan la selección de los clones de interés.

- c. Finalmente, los fagos no retenidos ni en a, ni en b se enfrentan a un pocillo sensibilizado con hTL1A-*Fc* pre-incubado con los nanoanticuerpos del grupo G1, que se unirán a sus sitios correspondientes, dejando libres otros sitios de la molécula que hipotéticamente podrían corresponder al sitio de unión con DR3. El objetivo de esta etapa es retener aquellos clones que se unan a epítopes diferentes a los del grupo G1, y que por tanto no se encontrarán ocupados en el pocillo de panning.

La hipótesis manejada es que de esta forma aumentamos la probabilidad de encontrar clones que reconozcan epítopes involucrados en la unión de TL1A-DR3, y por tanto capaces de bloquear dicha interacción.

Tabla. 15. Resultados de las rondas de panning de hTL1A-*Fc* Pre absorbido (Grupo G3)

Ronda	Coating	Input	Output	Ratio	Lavados	Clones Analizados	Reconocen	Inhiben
1	10 µg/mL	4.0x10 ¹²	2.5x10 ⁸	6.3x10 ⁻⁵	Permisivos	10	Si	No
2		3.2x10 ⁹	8.2x10 ⁷	2.5x10 ⁻²	2 Rondas de 10 Comunes	10	Si	No

Como se puede observar (Ver Tabla 15.), el ratio también crece aproximadamente 3 órdenes de magnitud entre la primera y segunda ronda de panning. Los lavados de la segunda ronda fueron exhaustivos, permitiendo seleccionar los clones más afines.

Se aislaron clones individuales como se explicó en la sección anterior, y se sometieron a un screening de reconocimiento de hTL1A mediante *ELISA*. Además, se probó su capacidad inhibitoria mediante el *ELISA* de inhibición, tal y como se realizó con los grupos anteriores (desde el plásmido pComb3X, no mostrado). Lamentablemente, si bien

todos los clones obtenidos fueron capaces de reconocer hTL1A de forma satisfactoria (absorbancias mayores a 1 UA), ninguno fue capaz de inhibir la interacción.

Para descartar que los nanoanticuerpos producidos no fueran capaces de inhibir la unión ligando-receptor por presentarse en una concentración insuficiente, decidimos realizar el subclonaje de todos los clones del *output* de la ronda 2 de este panning (que contendrá todas las secuencias de los nanoanticuerpos que testamos en el screening) desde el plásmido fagémido pComb3X al plásmido de expresión pET-28a antes utilizado. (Ver metodologías sección 3.2.1.13.1). Se aislaron colonias (clones individuales) que se cultivaron e indujeron de igual forma que en los anteriores (Ver metodologías sección 3.2.1.16.) y se obtuvo la fracción periplásmica tras el sonicado (Ver metodologías 3.2.1.17). Se confirmó su reconocimiento por *ELISA* agregando la fracción soluble en 1/50. (Ver Fig. 39.)

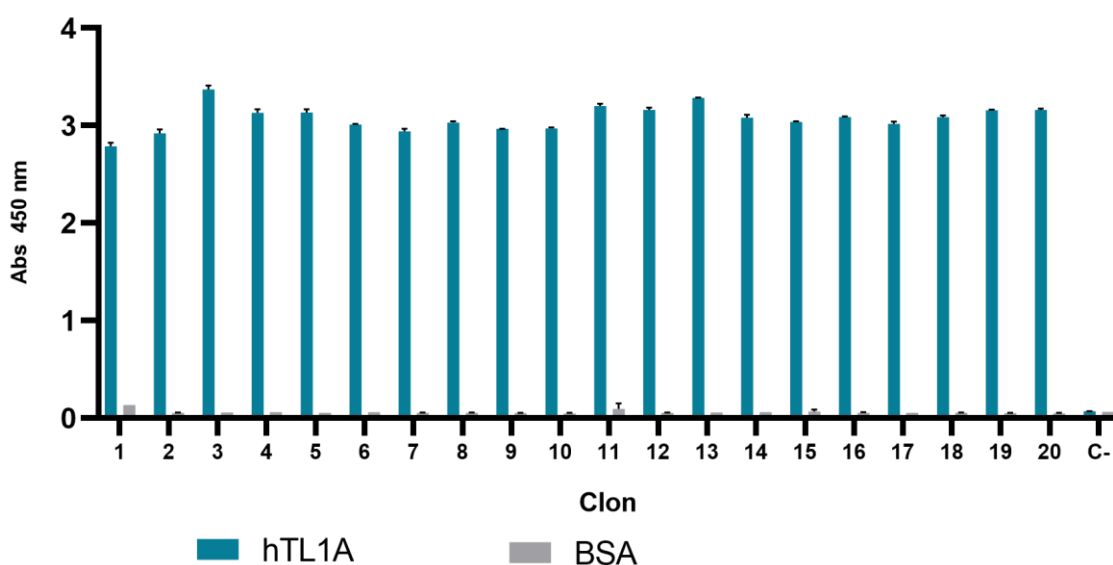


Fig. 39. Gráfico de barras representando la señal obtenida por de la unión entre hTL1A y los nanoanticuerpos seleccionados por *Phage Display*, grupo G3. Se representa el *output* 2 (segunda ronda) pasado a pET28a en dilución 1/50.

Se evaluó la inhibición de varios clones, partiendo de una dilución 1/50 de sonicado para prevenir señal de fondo alta. Si bien los clones se lograron producir eficazmente (Ver Fig. 40.), no se logró visualizar inhibición en el ensayo de *ELISA*. (Ver Fig. 41)

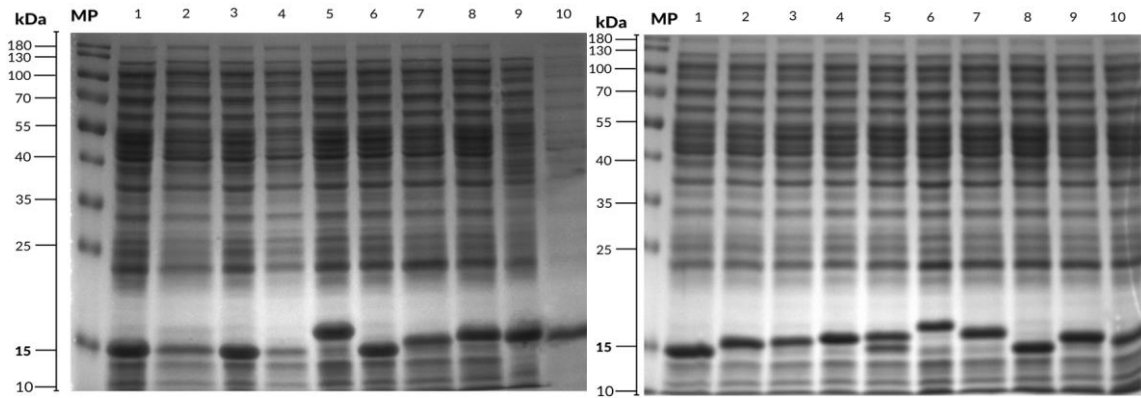


Fig. 40. Expresión de clones positivos (1-20) en pET28a analizados por *SDS-PAGE*. Se observan bandas intensas a la altura de aproximadamente 15 kDa correspondiente al tamaño de los nanoanticuerpos producidos. Existen variaciones en tamaño entre clones (de menor o mayor peso molecular) así como también una diferencia entre la eficiencia de expresión (mayor o menor intensidad de banda)

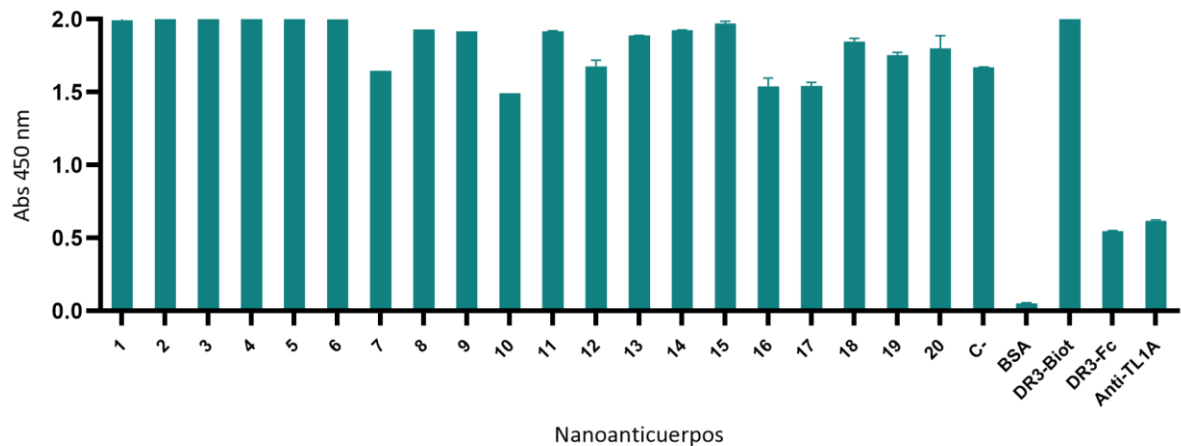


Fig. 41. Gráfico de barras representando la señal obtenida por la inhibición de la unión entre hTL1A y hDR3 frente al agregado de los nanoanticuerpos del grupo G3 (20 clones del *output 2* en pE-28a en dilución 1/50). Se observa a la derecha los controles: “DR3-Biot”- Control positivo de unión, “DR3-Fc”- Control negativo de competencia, “Anti-TL1A”- Anticuerpo monoclonal inhibidor, C- anticuerpo sin especificidad, BSA- pocillo sin *coating*.

Cabe destacar que la estrategia de subclonar el *output* entero de un *panning*, a un plásmido de producción como es el pET28a nos permitirá evaluar más clones producidos en altas concentraciones, de una forma más expeditiva que subclonando clones individualmente, por lo que su implementación es de crucial importancia (para éste y otros futuros desarrollos).

Resta por implementar una metodología para la purificación de varios clones de nanoanticuerpos simultáneamente, para lograr concentraciones aún mayores, evitando además la compleja matriz de otras proteínas presentes en el sonicado, que pueden influir negativamente en el ensayo de *ELISA*.

Las secuencias de cada grupo (G1, G2, G3) fueron analizadas mediante el método de Sanger y comparadas entre ellas. De dicho análisis (el cual es confidencial) se desprende que los grupos G1 y G2, comparten la mayor parte de secuencias, como ya fue mencionado con anterioridad. Sin embargo, el grupo G3 muestra muchas secuencias nuevas, lo que indica que, si bien la estrategia de pre-adsorción no seleccionó nanoanticuerpos bloqueantes, si demostró ser útil para aumentar la diversidad de clones con especificidad diferente a los que habíamos seleccionado en primera instancia.

4.1.9. Interacción cruzada de los nanoanticuerpos α -hTL1A con mTL1A

A la hora de realizar los ensayos de validación *in vivo* de los nanoanticuerpos, en los que se evalúa su eficacia y toxicidad en modelos animales inmunocompetentes (en el caso de la psoriasis, el modelo de psoriasis inducida por *imiquimod* en ratones), resulta muy ventajoso obtener nanoanticuerpos que presenten *cross*-reactividad entre TL1A de origen humano y la de ratón. Además, cabe destacar que las secuencias de TL1A humana y murina, poseen un porcentaje de homología de 66%, lo cual aumenta las probabilidades de obtener clones *cross*-reactivos. (Ver Fig. 1. Anexo.)

Para ello, se llevó a cabo un ELISA de reconocimiento cruzado sensibilizando con mTL1A a 1 μ g/mL y empleando los anticuerpos α -hTL1A purificados (Grupo G1) también a 1 μ g/mL. (Ver Fig. 42).

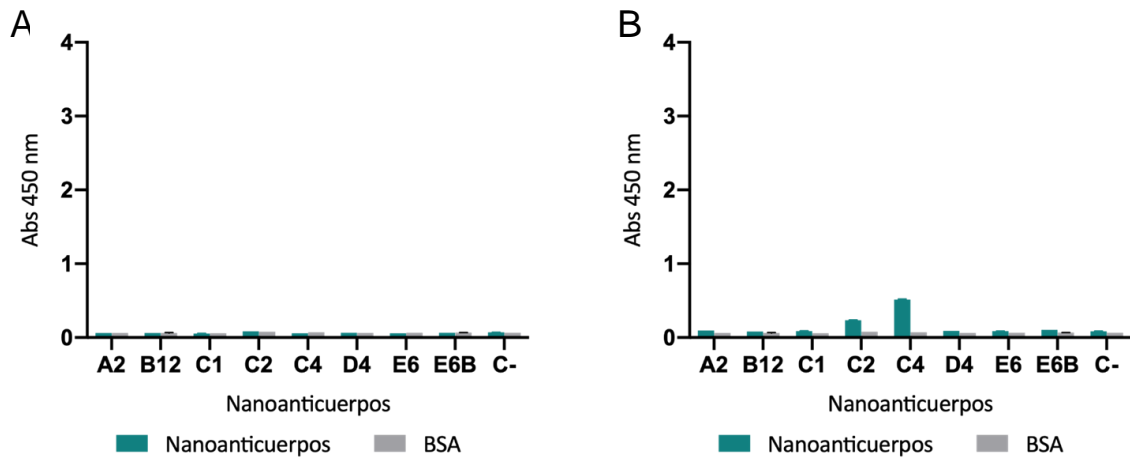


Fig. 42. Gráficos de barras representando los *ELISAs* de reconocimiento de los nanoanticuerpos producidos y purificados G1 por la proteína mTL1A. A la izquierda se muestra el mismo empleando una mTL1A comercial, mientras que a la derecha se utilizó una mTL1A producida en Baculovirus.

Se realizó el ensayo tapizando pocillos con 2 proteínas TL1A murinas de distintos orígenes (producida en *E. coli* y Baculovirus). Se incubaron los nanoanticuerpos purificados en la etapa anterior (G1), revelando la unión con un anticuerpo anti-HA-HRP.

En ambos ensayos los resultados demuestran que no existe un reconocimiento cruzado por los anticuerpos seleccionados frente a la versión murina de TL1A, presentando en todos los casos señales menores a 0.2 UA. En el caso de mTL1A expresado en Baculovirus, se puede observar un leve incremento de la señal correspondiente al nanoanticuerpo C4 y C2 (0.4 UA). Sin embargo, se considera negativo, porque la señal es apenas distinguible frente al ruido de fondo.

Debido a que no se detectó un clon capaz de reconocer mTL1A, se deduce que ninguno de los clones reconoce las zonas conservadas evolutivamente interespecie.

Para intentar seleccionar clones *cross*-reactivos para versión murina, procedimos a realizar 3 rondas de *panning* a partir de la biblioteca de fagos reconstituida anteriormente. (Ver metodologías sección 3.2.1.10).

Tabla. 16. Resultados de las rondas de panning de mTL1A (*coating*) producido en Baculovirus

Ronda	Coating	Input	Output	Ratio	Lavados	Clones Analizados	Reconocen	Inhiben
1		4.0x10 ¹²	5.0x10 ⁸	1.2x10 ⁻⁴	Permisivos	-	-	-
	10 µg/mL	6.7x10 ¹⁰	1.1x10 ⁷	1.6x10 ⁻⁴	2 Rondas de 10 Comunes	-	-	-
2		1.3X10 ¹²	7.0x10 ⁸	5.6x10 ⁻⁴	3 Rondas de 10 Comunes	10	No	No

Los resultados muestran (Ver Tabla 16.) que los títulos de *outputs* no incrementaron a tras las tres rondas realizadas. Por otro lado, el *ratio* (*output/input*) calculado se mantuvo constante, lo que sugiere que no se logró un enriquecimiento específico contra mTL1A luego de cada ronda.

Este resultado no es del todo inesperado, considerando que la biblioteca presentaba ya un sesgo de 3 rondas de selección contra la versión de TL1A humana. Además, la misma fue generada a partir de una llama inmunizada con hTL1A, por lo que, incluso partiendo de una biblioteca no sesgada, el repertorio capaz de reconocer la variable murina era de partida, sensiblemente menor.

Finalmente, a modo de confirmación, se realizó un *ELISA* de reconocimiento de los nanoanticuerpos anti-mTL1A producidos mediante esta estrategia de *panning* (Ver Fig. 43.). Se observa que la señal de los clones seleccionados frente a la variante murina es casi nula en todos los casos, presentando valores apenas por encima de la señal basal. Sin embargo, realizando el mismo ensayo y probando dichos clones contra hTL1A-Fc (No mostrado), se obtuvieron valores de absorbancia mayores a 2 UA.

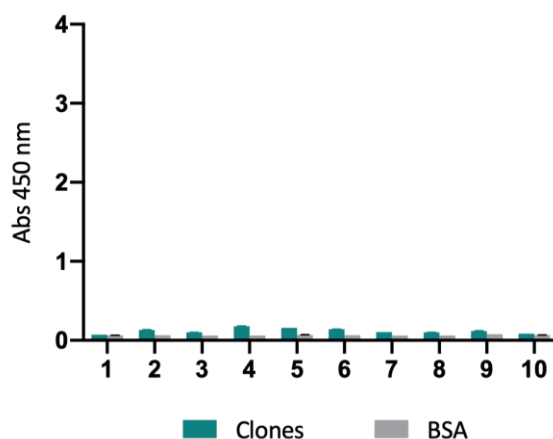


Fig. 43. Representación *ELISA* de *screening* de reconocimiento de nanoanticuerpos anti-mTL1A obtenidos de sobrenadantes inducidos de pComb3X, seleccionados por la técnica de *panning*.

Dichos resultados sugieren que en la biblioteca analizada no existen nanoanticuerpos capaces de reaccionar con la variante murina de TL1A. Al no tener a disposición la biblioteca de V_HHs original (sin haber pasado por rondas de *panning* previas), se plantea como opción a futuro dar *boosters* con mTL1A a la llama previamente inmunizada con hTL1A para favorecer la activación y proliferación de clones de células B de memoria que reconozcan a ambas versiones, o partir de una biblioteca con menor sesgo sobre la variante humana.

4.1.10. Desarrollo de transformantes transitorias de HEK-293 expresando hTL1A

Otro de los objetivos planteados en esta tesis fue evaluar la unión de los nanoanticuerpos producidos y purificados (grupo G1) a la proteína hTL1A expresada transitoriamente en la membrana de células HEK-293 (tal cual se encuentra expresada en el organismo) mediante citometría de flujo. Asimismo, se buscó poner a punto la unión entre hTL1A presente en membrana y hDR3 soluble, para poder evaluar la capacidad de neutralización de esa unión por parte de los nanoanticuerpos, mediante una técnica más fiel a la realidad que el *ELISA*.

Se transformaron las células HEK-293 con el plásmido *pCDNA3.1_hTL1A*. Una vez alcanzada la confluencia necesaria, se colectaron, centrifugaron y marcaron con los anticuerpos control, nanoanticuerpos, o DR3-Fc, según correspondiese.

Las muestras fueron analizadas en el equipo *BD Accuri™ C6 Plus Flow Cytometer* (*BD BioSciences*), perteneciente al Institut Pasteur de Montevideo bajo la supervisión de un técnico especializado. (Ver Fig. 44).

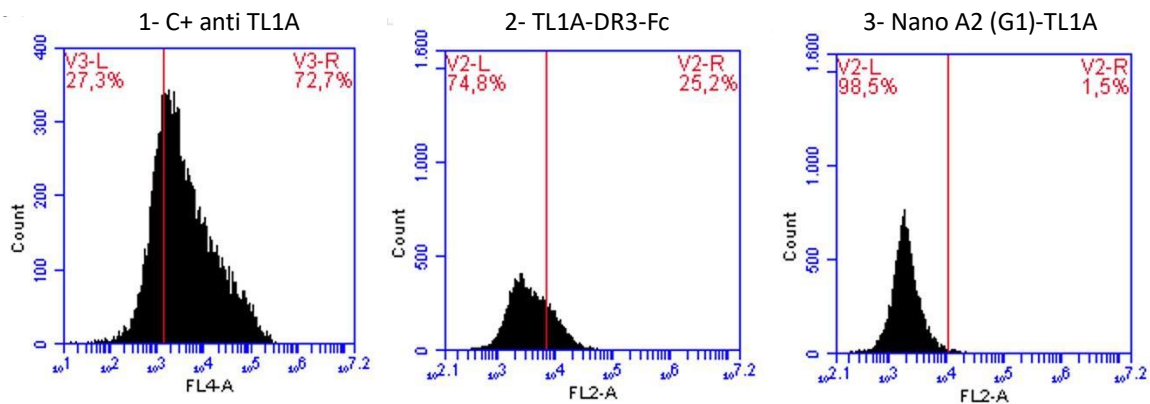


Fig. 44. Cromatogramas representativos del análisis por citometría de flujo de las células transfectantes transitorias, expresando hTL1A en su membrana. De izquierda a derecha: 1. Control positivo de transfección empleando un anticuerpo anti-hTL1A conjugado a Alexa Fluor. 2. Unión de hTL1A expresado en membrana frente al agregado de hDR3-Fc. 3. Unión de nanoanticuerpo A2 del grupo G1 frente a hTL1A expresada en membrana (representativo de la señal obtenida con el resto de nanoanticuerpos)

Como puede observarse en la figura, las células HEK-293 fueron transformadas exitosamente, expresando hTL1A en la membrana celular. Se obtuvo un 72.7% de células transfectadas. (Ver Fig. 44, izquierda)

Sin embargo, solamente un 25.2% presentó una señal de interacción con el receptor hDR3-Fc soluble. Por ello, este resultado se considera bajo para sentar base a estudios de inhibición, con el agregado de nanoanticuerpos, por citometría.

A su vez, el reconocimiento de los clones de nanoanticuerpos G1 por su *target* hTL1A en citometría, resultó del 0%. Este resultado es sorprendente, dado que todos ellos fueron capaces de reconocerla *in-vitro* en ensayos de *ELISA*, incluso con señales de unión mayores a 2 UA.

Existen dos hipótesis manejadas frente a este resultado:

- a. Que la conformación tridimensional de hTL1A presente en la membrana celular exponga epítopes no reconocidos por parte de los nanoanticuerpos seleccionados

(variando su conformación con respecto a lo estabilizado en placa de *ELISA*), así como enmascarando aquellos a los que presentaban afinidad. Esta hipótesis no es muy probable, ya que el uso de proteínas recombinantes fusionadas a *Fc* (producidas en células eucariotas) es ampliamente utilizado justamente para “mimificar” la conformación en que los dominios extracelulares de las proteínas transmembrana se presentan en una célula.

- b. Una deficiencia en el reactivo de revelado anti-HA-PE, el cual no mantuvo la cadena de frío adecuada durante el transporte al laboratorio, pudiendo haberse degradado y no generando una señal para la unión molecular existente entre hTL1A-Nanoanticuerpo.

De todas formas, estas hipótesis no explican el por qué la unión entre hTL1A y su receptor soluble tampoco fue razonablemente buena, solamente siendo visible en un escaso 5.2% de las células. Cabe recordar que dicha unión fue revelada con otro reactivo (anti-*Fc*-PE), por lo cual es independiente del punto b expuesto anteriormente.

Más investigaciones deben realizarse a futuro con respecto al análisis de dicha unión por citometría, pudiendo incluso evaluar la posibilidad de invertir los roles de unión: expresando hDR3 en la membrana celular, y añadiendo hTL1A de forma soluble. De esta forma se estaría en condiciones más fieles aún a lo ocurrido en la naturaleza.

4.1.11. Generación de un banco de células del sistema inmune TF-1, U87-MG y DH82.

Otro objetivo importante es el análisis *in-vitro* de la actividad biológica. Se decidió elaborar un banco celular (Ver metodologías sección 3.2.3.). de las líneas más frecuentemente utilizadas para evaluar la actividad biológica de los *targets* actualmente abordados por el grupo (TF-1 conteniendo el receptor DR3 humano, IL-13 e IL-4; U87-MG, conteniendo el receptor de IL-31 humano y DH82, conteniendo el receptor de IL-31 canino).

Las mismas fueron crecidas desde el *stock* inicial proveniente de ATCC hasta tener suficientes para generar 5 viales de *Master Cell Bank*, y 5 viales de *Working Cell Bank*, a una concentración de $2-10 \times 10^6$ células/vial. (Ver Fig. 45.)



Fig. 45. Imágenes tomadas desde el microscopio, durante la realización del banco celular, mostrando las tres principales líneas celulares de interés a trabajar. En el primer cuadrante se observan las células TF-1, las cuales son en suspensión con morfología esférica definida. En el segundo cuadrante se observan las U87-MG con morfología típica de astrocito, en adherencia. Por último, se observan las DH82 adheridas a la placa de cultivo, presentando una morfología esférica, con leves elongaciones.

4.2. Proyecto Interleuquinas

El proyecto interleuquinas surgió de la necesidad de evaluar otros potenciales *targets* para desarrollos de fármacos biológicos de aplicación tópica. De esta manera, se decidió comenzar por la IL-4, IL-13 e IL-31, todas involucradas en la inmunopatogenia de la dermatitis atópica (Ver introducción sección 1.5)

4.2.1. Inmunización y generación de una biblioteca de nanoanticuerpos anti-IL4, IL13 e IL31.

Lo primero que se llevó a cabo, fue la inmunización de un *camélido* con las proteínas *target* a evaluar (IL-4h, IL-13h, IL-31c, siendo “h” de origen humano, y “c” de origen canino). Dicho procedimiento, así como el seguimiento de los títulos de respuesta frente a las inmunizaciones, fue realizado por la Ing. Laura Salaberry y la Dra. Lucía Vanrell, previo al inicio de esta tesis.

Luego de alcanzar un título aceptable, se extrajeron 200 mL de sangre periférica del animal, y se elaboró una biblioteca de nanoanticuerpos (Ver metodologías sección 3.2.1.15.). A continuación, se realizaron los procesos de rondas de selección de nanoanticuerpos por *phage display*.

Finalmente, luego de seleccionar nanoanticuerpos para cada uno de los *targets*, se procedió con los ensayos de *screening* de reconocimiento y secuenciación de clones específicos.

4.2.2. Selección, *screening* y análisis de nanoanticuerpos generados a partir de una biblioteca de fagos contra IL-4h, IL13-m e IL31-c

IL-4 Humana

En el caso de la IL-4 humana, se realizaron diferentes rondas de *panning* utilizando diferentes versiones de la molécula (Ver Tabla 17.). En una primera instancia se efectuaron tres rondas utilizando IL-4 humana producida en *E. coli*, pero no se logró obtener ningún clon específico.

En una segunda instancia de selección se utilizó como proteína de *coating* una versión de IL-4 producida en células eucariotas (HEK-293), con las modificaciones post-traduccionales pertinentes. Lamentablemente no se obtuvo ningún clon reactivo.

En última instancia se decidió volver a realizar otro *set* de rondas contra la versión de IL-4 producida en *E. coli*, aumentando la concentración de *coating*, para maximizar las chances de retener los pocos clones positivos que podrían existir en la biblioteca. Se observó un aumento gradual en los *ratios* (título de *output*/título de *input*) de cada ronda, obteniéndose una marcada diferencia entre el *ratio* inicial y el de la cuarta ronda.

Tabla. 17. Resultados de las rondas de panning de IL 4 humana.

Proteína	Coating	R	Input	Output	Ratio	Lavados	Clones Analizados	Reconocen	
IL4h (<i>E. coli</i>)	10 ug/mL	1	1,7x10 ¹²	8,6x10 ⁶	5x10 ⁻⁶	Permisivos (10 comunes)	-	-	
		2	2,5x10 ¹²	5,0x10 ⁶	2x10 ⁻⁶		-	-	
		3	2,3x10 ¹²	4,7X10 ⁸	2x10 ⁻⁴		10	0	
IL4h (HEK)	10 ug/mL	1	1,7X10 ¹²	7.0x10 ⁶	4,0x10 ⁻⁶	Permisivos (10 comunes)	-	-	
		2	6.5x10 ¹¹	2.3x10 ⁶	1.8x10 ⁻⁶		-	-	
		3	3.1x10 ¹²	5.7x10 ⁶	1.8x10 ⁻⁶		5 rondas de 5 lavados	-	-
		4	3.5x10 ¹²	1.7x10 ⁷	4.9x10 ⁻⁶			-	-
		5	1.05x10 ¹²	6x10 ⁵	5.7x10 ⁻⁷			20	0
IL4h (<i>E. coli</i>)	50 ug/mL	1	Biblioteca: 1,7X10 ¹²	OUT1: 7.5x10 ⁵	4.4x 10 ⁻⁷	Permisivos (10 comunes)	-	-	
		2	OUT1A: 7.3 x10 ¹⁰	OUT2: 1.6x10 ⁵	1.8 x 10 ⁻⁵		-	-	
		3	OUT2A: 6.5x 10 ¹²	OUT3: 1.18 x 10 ⁸	1.8 x 10 ⁻⁵		-	-	
	10 ug/mL	4	OUT3A: 5,0 x 10 ¹¹	OUT4: 7.3x10 ⁶	1.4x10 ⁻⁵	3 Rondas de 10 Comunes con 5 min	10	7	

El *screening* de reconocimiento con esta variación en el *coating* dio como resultado 7 nanoanticuerpos específicos, de los 20 analizados mediante *ELISA*. (Ver Fig. 46.).

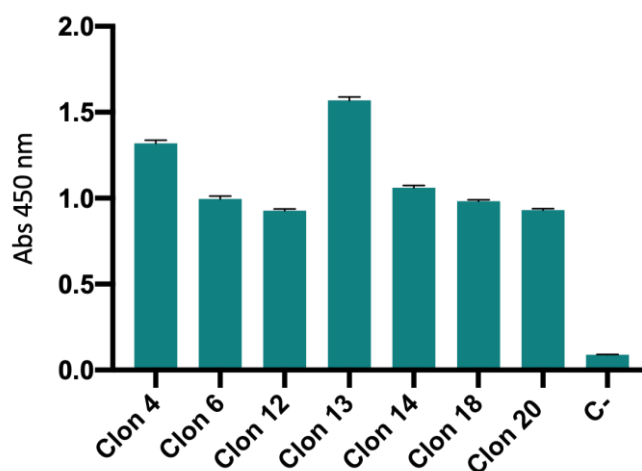


Fig. 46. Diagrama de barras mostrando la señal obtenida en el *screening* de reconocimiento de IL-4 humana por medio de los clones seleccionados en el último *set* de rondas de *panning*. (*Output 4 de Set 3*).

Finalmente, dichos clones fueron enviados a secuenciar y el análisis de secuencias reveló que todas las secuencias eran iguales. Esa secuencia fue subclonada en el vector pET-28a de expresión procariota para producirlo y purificarlo con la calidad necesarias para futuros ensayos de actividad.

IL-13 Murina

Se procedió a encontrar nanoanticuerpos *cross*-reactivos entre la versión de IL-13 humana (existiendo clones selectivos previamente aislados por el grupo de forma exitosa) y de ratón. Esto tiene como objetivo el poder probar la actividad neutralizante de los nanoanticuerpos seleccionados en modelos de dermatitis atópica en ratón, dando una primera experiencia previa a ensayos en humanos. Cabe destacar, que la llama utilizada para la generación de la biblioteca fue inmunizada con la versión de IL-13 humana.

Se realizaron dos *sets* de rondas de *panning* frente a una versión de IL-13 producida en *E. coli* (Ver Tabla 18.). En primera instancia se descartó el *set* inicial debido a que todos los nanoanticuerpos evaluados presentaron reactividad cruzada con la solución de bloqueo BSA. (No mostrado).

Tabla. 18. Resultados de las rondas de panning de IL 13 murina.

Proteína	Coating	Bloqueo	Rondas	Input	Output	Ratio	Lavados	Clones Analizados	Reconocen
IL13m (<i>E. coli</i>)	10 ug/mL	BSA	1	1,7X10 ¹²	3.5x10 ⁶	2.1x10 ⁻⁶			
			2	4.9x10 ¹¹	5.0x10 ⁷	1.0x10 ⁻⁴	Permisivos (2 rondas de 5)	20	0
			3	8.2X10 ¹¹	3.8x10 ⁹	3.0x10 ⁻³			
		Gelatina	1	1,7X10 ¹²	2.2x10 ⁶	1.3x10 ⁻⁶	Permisivos (10 comunes)	-	-
			2	6.0x10 ¹⁰	6.0x10 ⁴	1.0x10 ⁻⁶		-	-
			3	2.1x10 ¹⁰	8.8x10 ⁷	4.2x10 ⁻³	5 rondas de 5 lavados	10	10
			4	3.5x10 ¹²	1.0x10 ¹⁰	2.9x10 ⁻³		10	9

Para evitar la selección de clones *cross*-reactivos con BSA, se procedió a repetir el ensayo de *panning* sustituyendo la solución de bloqueo por PBS-Gelatina 1%. Este cambio permitió seleccionar clones con especificidad selectiva por IL-13m impidiendo la amplificación de los clones *cross*-reactivos contra BSA.

Como se puede observar en el *screening* llevado a cabo del *output* 3 y 4 de dicho *set* de rondas (Ver Fig. 47), se obtuvieron 19 colonias positivas de las 20 totales analizadas. Las mismas fueron sometidas luego a un análisis por secuenciación. Los resultados arrojaron que de las colonias positivas se obtuvieron 3 secuencias distintas de nanoanticuerpos. Finalmente, dichos clones fueron subclonados al vector pET-28a para producirlos y purificarlos en cantidad y pureza suficiente para futuros ensayos de actividad.

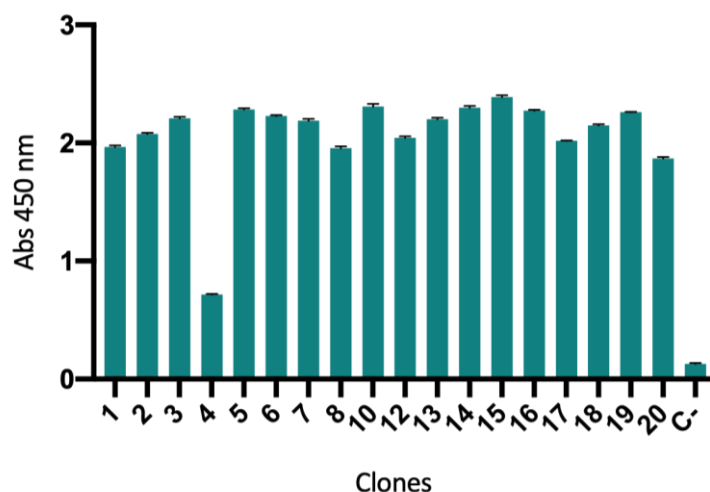


Fig. 47. Diagrama de barras mostrando la señal obtenida en el *screening* de reconocimiento de IL-13 murina por medio de los clones seleccionados en el último set de *panning*. (*Output 3 de Set 2*).

IL-31 Canina

Si bien en la introducción de esta tesis se abordaron las enfermedades inflamatorias de piel con foco en humanos, no son los únicos afectados por las mismas. Por ejemplo, la dermatitis atópica canina (DAc) es una enfermedad muy prevalente en perros (10-15%) afectando su calidad de vida. Estudios demuestran que el bloqueo de IL-31 mejora la sintomatología, aliviando principalmente la sensación pruriginosa.

Previamente se seleccionaron nanoanticuerpos anti-IL-31 exitosamente por parte del grupo, es por ello, que en esta tesis se abordó la selección contra su variante canina, por la metodología de *Phage Display*.

Se realizaron rondas de *panning* con una versión producida en *E. coli* (Ver Tabla 19.). Se observó un aumento de dos órdenes en el *ratio output/input* al transcurrir las rondas de *panning*, lo que sugiere un enriquecimiento en clones específicos por IL31c.

Tabla. 19. Resultados de las rondas de panning de IL 31 canina.

Proteína	Coating	Rondas	Input	Output	Ratio	Lavados	Clones Analizados	Reconocen
IL31c (<i>E. coli</i>)	10 ug/mL	1	1,7X10 ¹²	5,4x10 ⁶	3x10 ⁻⁶			
		2	No contable	6,2x10 ⁶	-	Permisivos (10 comunes)	-	-
		3	1,0x10 ¹²	4,3X10 ⁸	4,3x10 ⁻⁴			
		4	1.0X10 ¹²	5.3X10 ⁸	5.3X10 ⁻⁴	Estricto	20	19

Habiendo realizado un *screening* de 20 colonias del último *output*, se obtuvieron 19 clones positivos capaces de reconocer la variante canina sensibilizada en placa de *ELISA*. (Ver Fig. 48)

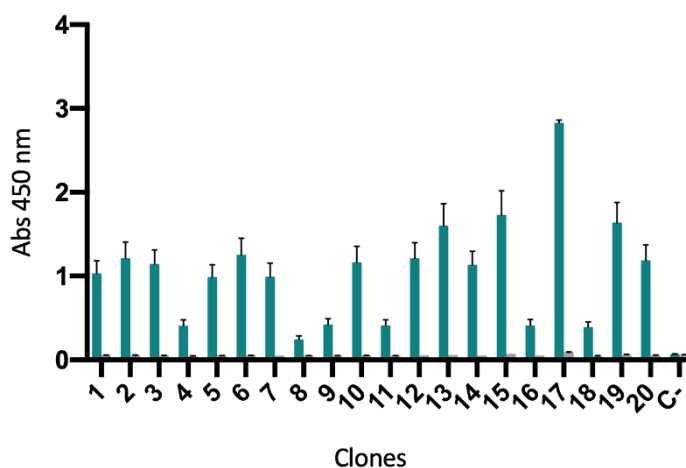


Fig. 48. Diagrama de barras mostrando la señal obtenida en el *screening* de reconocimiento de IL-31 canina por medio de los clones seleccionados en el último set de rondas de *panning*. (*Output 4*).

No todos ellos presentaron los mismos niveles de absorbancia (rangos desde 1 a 3 UA), lo que podría sugerir que los diferentes clones presenten diferentes grados de afinidad por la molécula *target*. Análisis de secuenciación posteriores demostraron que se obtuvieron 6 secuencias distintas de nanoanticuerpos.

Dichos nanoanticuerpos fueron subclonados luego en pET-28a para su producción, purificación, y posterior evaluación de su actividad biológica.

5. Conclusiones

En este trabajo se realizó la generación, expresión y evaluación de diversos nanoanticuerpos contra citoquinas inflamatorias involucradas en la inmunopatogenia de diversas enfermedades inflamatorias, con especial énfasis en enfermedades de la piel.

Se concluye que se logró el cumplimiento del objetivo general. Se pudieron generar nuevos nanoanticuerpos contra cada una de las citoquinas “*target*” propuestas, por medio de la técnica de “*Phage Display*”. Así mismo, se logró su expresión en diferentes cepas de interés, y la evaluación de su reconocimiento y actividad, por técnicas de *ELISA* y citometría.

Por otro lado, con respecto a los objetivos específicos, se procede a listar las conclusiones en el mismo orden de presentación inicial:

- Luego de analizar diferentes cepas de expresión, se determinó que la cepa de *E. coli Lemo21*(DE3) fue la más adecuada para realizar la expresión de los nanoanticuerpos y proteínas recombinantes de interés.
- Se logró una correcta expresión de los nanoanticuerpos generados en la cepa bacteriana *Lemo21*(DE3) determinando las concentraciones de IPTG y ramnosa necesarios, así como el tiempo de inducción.
- Se evaluó el reconocimiento de los nanoanticuerpos α -hTL1A, obteniendo en todos los casos clones específicos en ensayo de *ELISA*.
- Así mismo, se realizó el *screening* cruzado de hTL1A con su análogo murino. Debido a que no fue posible encontrar clones con reactividad cruzada, se procedió a realizar rondas de *panning* con mTL1A. No se logró hasta el momento encontrar clones reactivos contra esta variante.
- Se logró poner a punto un ensayo de *ELISA* para visualizar la interacción entre TL1A y su receptor DR3.
- Se evaluó la capacidad inhibitoria de diversos clones de nanoanticuerpos en el *ELISA* de unión previamente puesto a punto. En primera instancia se utilizaron los clones

generados en trabajos anteriores -G1-, luego, se generaron dos tandas de clones nuevos a través de dos estrategias de *panning* (sin -G2- y con preabsorción -G3-). No se logró visualizar un descenso de señal acorde a la inhibición esperada en *ELISA* en las condiciones ensayadas.

- Se generaron transformantes transitorias de HEK-293 expresando hTL1A de forma satisfactoria y se comprobaron por citometría utilizando un control α -TL1A comercial. Sin embargo, no se logró ver la unión de los nanoanticuerpos a la proteína expresada, así como tampoco la unión a su receptor DR3 utilizando esta técnica.
- Se elaboraron bancos celulares de las líneas TF-1, U87-MG y DH82, células involucradas en los ensayos de actividad *in-vitro* a realizar a futuro para la evaluación de actividad biológica de los nanoanticuerpos generados en esta tesis.
- Se seleccionaron nanoanticuerpos contra IL-31c, IL-13m y IL-4h, comprobando luego su reconocimiento de forma satisfactoria en ensayos de *ELISA*.

6. Perspectivas a futuro

Los resultados obtenidos a lo largo de este proyecto de tesis proporcionaron las siguientes ideas para futuras investigaciones y su continuidad con las líneas de investigación desarrolladas:

- A. Sería de conveniencia evaluar la expresión de clones de difícil expresión proteica, evaluando las mejores condiciones para sortear las dificultades generadas. Probar optimizaciones individuales tanto de cepas a usar, tiempos o concentraciones de inductor.
- B. Por otro lado, profundizar en el conocimiento de la interacción molecular y estructura tridimensional entre ligando y receptor, ayudaría a establecer diversas formas para estabilizar esta unión y consecuentemente su inhibición con los nanoanticuerpos. Herramientas como el SPR (*Biacore*®) permitirían realizar un mapeo de epítopes de unión y competencia con el receptor en cuestión de manera sencilla y rápida.
- C. Para conseguir nanoanticuerpos con reactividad cruzada entre humano y ratón, se podrían realizar *boosters* con las variantes de ratón a aquellos animales previamente inmunizados con las variantes humanas, y así expandir clones B de memoria con reactividad cruzada. Posteriormente habrá que construir la biblioteca de nanoanticuerpos, que nos permitirá obtener clones *cross* reactivos mediante las técnicas de *phage display* utilizadas en esta tesis.
- D. Es importante también, evaluar la *cross* reactividad de los clones de interleuquinas generados por sus variantes no utilizadas en *panning*. Por ejemplo, es de interés evaluar los clones anti-IL-4 contra su variante murina, los clones anti-IL-13 y anti-IL-31 contra su variable humana o murina
- E. Por otro lado, los bancos celulares generados en esta tesis nos permitirán generar a futuro ensayos de actividad biológica *in-vitro* los cuales sentarán las bases para validar nuestros nanoanticuerpos en un modelo biológico, previo a la utilización de animales de experimentación.

Para TL1A, se utilizarán las células TF-1, analizando proliferación celular y/o apoptosis mediante el agregado de un rango de concentraciones de citoquina. Luego, se evaluará la eficacia inhibitoria de los nanoanticuerpos generados para apagar o disminuir la respuesta, mediante el agregado de los mismos al medio de cultivo.

Para la IL-4 e IL-13, se realizarán ensayos en células TF-1, analizando la proliferación celular en presencia/ausencia de citoquina, midiendo la respuesta activadora para las vías de STAT6 y MAPK. Se repetirán dichos ensayos en presencia de nanoanticuerpos inhibidores.

Para la IL-31, se realizarán ensayos en células U87-MG (en el caso de su variante humana) o DH82 (en caso de su variante canina) analizando la vía de activación de STAT3 y ERK1/2 mediante la suplementación con citoquina y en presencia / ausencia de nanoanticuerpo inhibidor.

- F. Otra línea interesante que se explorará en futuras investigaciones es la posibilidad de generar nanoanticuerpos estabilizados de administración sistémica. Esto resulta importante ya que se presenta como una alternativa frente a un posible resultado negativo respecto a la administración tópica o en casos donde la misma es poco apropiada (el tratamiento de dermatitis atópica en perros requiere de administración sistémica).
- G. Para realizar dicha administración, es fundamental fusionar a los nanoanticuerpos a otras proteínas, que le confieran un aumento sustancial de tamaño, permitiendo no ser filtrados en riñón a las pocas horas de ser administrados, aumentando su vida media.
- H. Finalmente, unos de los desafíos a futuro más grandes, es el de realizar y analizar ensayos de penetrabilidad de los nanoanticuerpos generados en modelos de piel (*in-vivo* en modelos animales o *in-vitro* en cultivo en tres dimensiones). Investigaciones sobre las características necesarias de la matriz que contenga estos nanoanticuerpos también será un gran tema a tratar.

7. Referencias Bibliográficas

- (1) Deniz AAH, Abdik EA, Abdik H, Aydın S, Şahin F, Taşlı PN. Zooming in across the Skin: A Macro-to-Molecular Panorama. *Advances in experimental medicine and biology* [Internet]. 2020 [citado 2022 Sep 17];1247:157–200. Disponible desde: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/31953808/>. doi:10.1007/5584_2019_442
- (2) Kolarsick PAJ, Kolarsick MA, Goodwin C. Anatomy and Physiology of the Skin. *Journal of the Dermatology Nurses' Association* [Internet]. 2011 [accessed 2022 Sep 18];3(4):203–213. Disponible desde: https://journals.lww.com/jdnaonline/Fulltext/2011/07000/Anatomy_and_Physiology_of_the_Skin.3.aspx. doi:10.1097/JDN.0B013E3182274A98
- (3) Yousef H, Alhadj M, Sharma S. Anatomy, Skin (Integument), Epidermis. *StatPearls* [Internet]. 2021 Nov 19 [accessed 2022 Sep 18]. Disponible desde: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK470464/>
- (4) Schwingen J, Kaplan M, Kurschus FC. Review-Current Concepts in Inflammatory Skin Diseases Evolved by Transcriptome Analysis: In-Depth Analysis of Atopic Dermatitis and Psoriasis. *International journal of molecular sciences* [Internet]. 2020 [accessed 2022 Sep 18];21(3). Disponible desde: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/31973112/>. doi:10.3390/IJMS21030699
- (5) Pasparakis M, Haase I, Nestle FO. Mechanisms regulating skin immunity and inflammation. *Nature reviews. Immunology* [Internet]. 2014 [accessed 2022 Sep 18];14(5):289–301. Disponible desde: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/24722477/>. doi:10.1038/NRI3646
- (6) Campione E, Lanna C, Diluvio L, Cannizzaro MV, Grelli S, Galluzzo M, Talamonti M, Annicchiarico-Petruzzelli M, Mancini M, Melino G, et al. Skin immunity and its dysregulation in atopic dermatitis, hidradenitis suppurativa and vitiligo. *Cell Cycle* [Internet]. 2020 [accessed 2022 Sep 18];19(3):257. Disponible desde: [/pmc/articles/PMC7028161/](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/31973112/). doi:10.1080/15384101.2019.1707455
- (7) Quaresma JAS. Organization of the Skin Immune System and Compartmentalized Immune Responses in Infectious Diseases. *Clinical microbiology reviews* [Internet]. 2019 [accessed 2022 Sep 18];32(4). Disponible desde: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/31366611/>. doi:10.1128/CMR.00034-18
- (8) Quaresma JAS, Sotto MN, Balato A. Inflammatory and Immune-Mediated Cutaneous Diseases. *Mediators of Inflammation* [Internet]. 2017 [accessed 2022 Sep 18];2017. Disponible desde: [/pmc/articles/PMC5763210/](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/31973112/). doi:10.1155/2017/6793968

- (9) Seth D, Cheldize K, Brown D, Freeman EE. Global Burden of Skin Disease: Inequities and Innovations. *Current dermatology reports* [Internet]. 2017 [accessed 2022 Sep 18];6(3):204–210. Disponible desde: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/29226027/>. doi:10.1007/S13671-017-0192-7
- (10) Lim HW, Collins SAB, Resneck JS, Bologna JL, Hodge JA, Rohrer TA, van Beek MJ, Margolis DJ, Sober AJ, Weinstock MA, et al. The burden of skin disease in the United States. *Journal of the American Academy of Dermatology* [Internet]. 2017 [accessed 2022 Sep 18];76(5):958-972.e2. Disponible desde: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/28259441/>. doi:10.1016/J.JAAD.2016.12.043
- (11) Armstrong AW, Read C. Pathophysiology, Clinical Presentation, and Treatment of Psoriasis: A Review. *JAMA* [Internet]. 2020 [accessed 2022 Sep 18];323(19):1945–1960. Disponible desde: <https://jamanetwork.com/journals/jama/fullarticle/2766169>. doi:10.1001/JAMA.2020.4006
- (12) Rendon A, Schäkel K. Psoriasis Pathogenesis and Treatment. *International Journal of Molecular Sciences* [Internet]. 2019 [accessed 2022 Sep 18];20(6). Disponible desde: </pmc/articles/PMC6471628/>. doi:10.3390/IJMS20061475
- (13) Blauvelt A, Chiricozzi A. The Immunologic Role of IL-17 in Psoriasis and Psoriatic Arthritis Pathogenesis. *Clinical reviews in allergy & immunology* [Internet]. 2018 [accessed 2022 Sep 18];55(3):379–390. Disponible desde: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/30109481/>. doi:10.1007/S12016-018-8702-3
- (14) Fuentes-Duculan J, Bonifacio KM, Hawkes JE, Kunjravia N, Cueto I, Li X, Gonzalez J, Garcet S, Krueger JG. Autoantigens ADAMTSL5 and LL37 are significantly upregulated in active Psoriasis and localized with keratinocytes, dendritic cells and other leukocytes. *Experimental dermatology* [Internet]. 2017 [accessed 2022 Sep 18];26(11):1075–1082. Disponible desde: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/28482118/>. doi:10.1111/EXD.13378
- (15) Lande R, Botti E, Jandus C, Dojcinovic D, Fanelli G, Conrad C, Chamilos G, Feldmeyer L, Marinari B, Chon S, et al. The antimicrobial peptide LL37 is a T-cell autoantigen in psoriasis. *Nature communications* [Internet]. 2014 [accessed 2022 Sep 18];5. Disponible desde: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/25470744/>. doi:10.1038/NCOMMS6621
- (16) Nestle FO, Conrad C, Tun-Kyi A, Homey B, Gombert M, Boyman O, Burg G, Liu YJ, Gilliet M. Plasmacytoid predendritic cells initiate psoriasis through interferon-alpha production. *The Journal of experimental medicine* [Internet]. 2005 [accessed 2022 Sep 18];202(1):135–143. Disponible desde: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/15998792/>. doi:10.1084/JEM.20050500
- (17) Furue M, Furue K, Tsuji G, Nakahara T. Interleukin-17A and Keratinocytes in Psoriasis. *International journal of molecular sciences* [Internet]. 2020 [accessed 2022 Sep 18];21(4). Disponible desde: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/32070069/>. doi:10.3390/IJMS21041275

- (18) Kokkotis G, Bamias G. TL1A as a therapeutic target in inflammatory bowel disease. <https://doi.org/10.1080/1744666X.2022.2074401> [Internet]. 2022 [accessed 2022 Sep 18];18(6):551–555. Disponible desde: <https://www.tandfonline.com/doi/abs/10.1080/1744666X.2022.2074401>. doi:10.1080/1744666X.2022.2074401
- (19) Meylan F, Richard AC, Siegel RM. TL1A and DR3, a TNF-family ligand-receptor pair that promotes lymphocyte costimulation, mucosal hyperplasia and autoimmune inflammation. *Immunological reviews* [Internet]. 2011 [accessed 2022 Sep 18];244(1):188–196. Disponible desde: </pmc/articles/PMC3882070/>. doi:10.1111/J.1600-065X.2011.01068.X
- (20) Liu S, Xu J, Wu J. The Role of Co-Signaling Molecules in Psoriasis and Their Implications for Targeted Treatment. *Frontiers in Pharmacology* [Internet]. 2021 [accessed 2022 Sep 18];12:1872. Disponible desde: doi:10.3389/FPHAR.2021.717042/BIBTEX
- (21) Li L, Fu L, Zhou P, Lu Y, Zhang L, Wang W, Nie J, Zhang D, Liu Y, Wu B, et al. Effects of tumor necrosis factor-like ligand 1A (TL1A) 16-24 hrs imiquimod-induced psoriasiform skin inflammation in mice. *Archives of Dermatological Research* [Internet]. 2020 [accessed 2022 Sep 18];312(7):481–490. Disponible desde: <https://link.springer.com/article/10.1007/s00403-019-02030-8>. doi:10.1007/S00403-019-02030-8
- (22) Aiba Y, Nakamura M. The role of TL1a and DR3 in autoimmune and inflammatory diseases. *Mediators of Inflammation* [Internet]. 2013 [accessed 2022 Sep 18];2013. Disponible desde: doi:10.1155/2013/258164
- (23) Silverberg JI, Barbarot S, Gadkari A, Simpson EL, Weidinger S, Mina-Osorio P, Rossi AB, Brignoli L, Saba G, Guillemin I, et al. Atopic dermatitis in the pediatric population: A cross-sectional, international epidemiologic study. *Annals of allergy, asthma & immunology : official publication of the American College of Allergy, Asthma, & Immunology* [Internet]. 2021 [accessed 2022 Sep 18];126(4):417-428.e2. Disponible desde: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/33421555/>. doi:10.1016/J.ANAI.2020.12.020
- (24) Barbarot S, Auziere S, Gadkari A, Girolomoni G, Puig L, Simpson EL, Margolis DJ, de Bruin-Weller M, Eckert L. Epidemiology of atopic dermatitis in adults: Results from an international survey. *Allergy* [Internet]. 2018 [accessed 2022 Sep 18];73(6):1284–1293. Disponible desde: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/29319189/>. doi:10.1111/ALL.13401
- (25) Yang G, Seok JK, Kang HC, Cho YY, Lee HS, Lee JY. Skin Barrier Abnormalities and Immune Dysfunction in Atopic Dermatitis. *International Journal of Molecular Sciences* [Internet]. 2020 [accessed 2022 Sep 18];21(8). Disponible desde: </pmc/articles/PMC7215310/>. doi:10.3390/IJMS21082867

- (26) Lowes MA, Suárez-Fariñas M, Krueger JG. Immunology of psoriasis. Annual review of immunology [Internet]. 2014 [accessed 2022 Sep 18];32:227–255. Disponible desde: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/24655295/>. doi:10.1146/ANNUREV-IMMUNOL-032713-120225
- (27) Roesner LM, Werfel T, Heratizadeh A. The adaptive immune system in atopic dermatitis and implications 16-24 hrs therapy. <http://dx.doi.org/10.1586/1744666X.2016.1165093> [Internet]. 2016 [accessed 2022 Sep 18];12(7):787–796. Disponible desde: <https://www.tandfonline.com/doi/abs/10.1586/1744666X.2016.1165093>. doi:10.1586/1744666X.2016.1165093
- (28) Castellani ML, Felaco P, Galzio RJ, Tripodi D, Toniato E, de Lutiis MA, Fulcheri M, Caraffa A, Antinolfi P, Tetè S, et al. IL-31 a Th2 cytokine involved in immunity and inflammation. International journal of immunopathology and pharmacology [Internet]. 2010 [accessed 2022 Sep 18];23(3):709–713. Disponible desde: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/20943040/>. doi:10.1177/039463201002300304
- (29) Vaillant AAJ, Qurie A. Interleukin. StatPearls [Internet]. 2021 [accessed 2022 Sep 18]. Disponible desde: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK499840/>
- (30) Arokiaraj J, Mugunthan A, Gupta PK. Interleukin types and its application. Indian Journal of Allergy, Asthma and Immunology [Internet]. 2020 [accessed 2022 Sep 18];34(2):57. Disponible desde: <https://www.ijaai.in/article.asp?issn=0972-6691;year=2020;volume=34;issue=2;spage=57;epage=62;aulast=Arokiaraj>. doi:10.4103/IJAAI.IJAAI_11_20
- (31) Egholm C, Heeb LEM, Impellizzeri D, Boyman O. The Regulatory Effects of Interleukin-4 Receptor Signaling 16-24 hrs Neutrophils in Type 2 Immune Responses. Frontiers in Immunology [Internet]. 2019 [accessed 2022 Sep 18];10(OCT):2507. Disponible desde: </pmc/articles/PMC6821784/>. doi:10.3389/FIMMU.2019.02507
- (32) Puar N, Chovatiya R, Paller AS. New treatments in atopic dermatitis. Annals of Allergy, Asthma & Immunology [Internet]. 2021 [accessed 2022 Sep 18];126(1):21–31. Disponible desde: doi:10.1016/J.ANAI.2020.08.016
- (33) Chiricozzi A, Maurelli M, Peris K, Girolomoni G. Targeting IL-4 for the Treatment of Atopic Dermatitis. ImmunoTargets and Therapy [Internet]. 2020 [accessed 2022 Sep 18];9:151. Disponible desde: </pmc/articles/PMC7532907/>. doi:10.2147/ITT.S260370
- (34) Nakahara T, Kido-Nakahara M, Tsuji G, Furue M. Basics and recent advances in the pathophysiology of atopic dermatitis. The Journal of Dermatology [Internet]. Disponible desde: <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/full/10.1111/1346-8138.15664>. doi:10.1111/1346-8138.15664

- (35) Furue M, Furue M. Interleukin-31 and Pruritic Skin. *Journal of Clinical Medicine* 2021, Vol. 10, Page 1906 [Internet]. 2021 [accessed 2022 Sep 18];10(9):1906. Disponible desde: <https://www.mdpi.com/2077-0383/10/9/1906/htm>. doi:10.3390/JCM10091906
- (36) Barnes PJ. Corticosteroids: The drugs to beat. *European Journal of Pharmacology* [Internet]. 2006 [accessed 2022 Sep 18];533(1–3):2–14. Disponible desde: doi:10.1016/J.EJPHAR.2005.12.052
- (37) Zubeldia JM. El libro de las enfermedades alérgicas [Internet]. 2022. [accessed 2022 Sep 18]. Disponible desde: <http://www.marcialpons.es/libros/el-libro-de-las-enfermedades-alergicas/9788492937837/>
- (38) Adcock IM, Barnes PJ. Molecular Mechanisms of Corticosteroid Resistance. *Chest* [Internet]. 2008 [accessed 2022 Sep 18];134(2):394–401. Disponible desde: doi:10.1378/CHEST.08-0440
- (39) Nelson PN, Reynolds GM, Waldron EE, Ward E, Giannopoulos K, Murray PG. Demystified : Monoclonal antibodies. *Molecular Pathology* [Internet]. 2000 [accessed 2022 Sep 18];53(3):111. Disponible desde: </pmc/articles/PMC1186915/>. doi:10.1136/MP.53.3.111
- (40) Abbas AK, Lichtman AH, Pillai S. *Inmunología celular y molecular*. [accessed 2022 Sep 18]:600.
- (41) Eyerich S, Metz M, Bossios A, Eyerich K. New biological treatments for asthma and skin allergies. *Allergy* [Internet]. 2020 [accessed 2022 Sep 18];75(3):546–560. Disponible desde: <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/full/10.1111/all.14027>. doi:10.1111/ALL.14027
- (42) Ogdie A, Coates LC, Gladman DD. Treatment guidelines in psoriatic arthritis. *Rheumatology* [Internet]. 2020 [accessed 2022 Sep 18];59(Supplement_1):i37–i46. Disponible desde: https://academic.oup.com/rheumatology/article/59/Supplement_1/i37/5802853. doi:10.1093/RHEUMATOLOGY/KEZ383
- (43) Dalziel M, Crispin M, Scanlan CN, Zitzmann N, Dwek RA. Emerging principles for the therapeutic exploitation of glycosylation. *Science* [Internet]. 2014 [accessed 2022 Sep 18];343(6166). Disponible desde: <https://www.science.org/doi/10.1126/science.1235681>. doi:10.1126/SCIENCE.1235681/SUPPL_FILE/DALZIEL.SM.COVER.PAGE.PDF
- (44) Liu L. Antibody Glycosylation and Its Impact 16-24 hrs the Pharmacokinetics and Pharmacodynamics of Monoclonal Antibodies and Fc-Fusion Proteins. *Journal of Pharmaceutical Sciences* [Internet]. 2015 [accessed 2022 Sep 18];104(6):1866–1884. Disponible desde: doi:10.1002/JPS.24444

- (45) Krueger JG. The immunologic basis for the treatment of psoriasis with new biologic agents. *Journal of the American Academy of Dermatology* [Internet]. 2002 [accessed 2022 Sep 18];46(1):1–26. Disponible desde: doi:10.1067/MJD.2002.120568
- (46) Rønholt K, Iversen L. Old and New Biological Therapies for Psoriasis. *International Journal of Molecular Sciences* [Internet]. 2017 [accessed 2022 Sep 18];18(11):2297. Disponible desde: <https://www.mdpi.com/1422-0067/18/11/2297/htm>. doi:10.3390/IJMS18112297
- (47) Wu J, Guttman-Yassky E. Efficacy of biologics in atopic dermatitis. <https://doi.org/10.1080/14712598.2020.1722998> [Internet]. 2020 [accessed 2022 Sep 18];20(5):525–538. Disponible desde: <https://www.tandfonline.com/doi/abs/10.1080/14712598.2020.1722998>. doi:10.1080/14712598.2020.1722998
- (48) Katoh N. Emerging treatments for atopic dermatitis. *The Journal of Dermatology* [Internet]. 2021 [accessed 2022 Sep 18];48(2):152–157. Disponible desde: <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/full/10.1111/1346-8138.15504>. doi:10.1111/1346-8138.15504
- (49) Hamers-Casterman C, Atarhouch T, Muyldermans S, Robinson G, Hammers C, Songa EB, Bendahman N, Hammers R. Naturally occurring antibodies devoid of light chains. *Nature* [Internet]. 1993. [accessed 2022 Sep 18];363(6428):446–448. Disponible desde: <https://www.nature.com/articles/363446a0>. doi:10.1038/363446a0
- (50) Conrath KE, Wernery U, Muyldermans S, Nguyen VK. Emergence and evolution of functional heavy-chain antibodies in Camelidae. *Developmental and Comparative Immunology* [Internet]. 2003 [accessed 2022 Sep 18];27(2):87–103. Disponible desde: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/12543123/>. doi:10.1016/S0145-305X(02)00071-X
- (51) Muyldermans S. Nanobodies: Natural Single-Domain Antibodies. <http://dx.doi.org/10.1146/annurev-biochem-063011-092449> [Internet]. 2013 [accessed 2022 Sep 18];82:775–797. Disponible desde: <https://www.annualreviews.org/doi/abs/10.1146/annurev-biochem-063011-092449>. doi:10.1146/ANNUREV-BIOCHEM-063011-092449
- (52) Cogné M, Preud'homme JL, Guglielmi P. Immunoglobulin gene alterations in human heavy chain diseases. *Research in immunology* [Internet]. 1989 [accessed 2022 Sep 18];140(5–6):487–502. Disponible desde: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/2551000/>. doi:10.1016/0923-2494(89)90115-6
- (53) Daley LP, Gagliardo LF, Duffy MS, Smith MC, Appleton JA. Application of monoclonal antibodies in functional and comparative investigations of heavy-chain immunoglobulins in new world camelids. *Clinical and diagnostic laboratory immunology*

[Internet]. 2005 [accessed 2022 Sep 18];12(3):380–386. Disponible desde: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/15753251/>. doi:10.1128/CDLI.12.3.380-386.2005

(54) Achour I, Cavelier P, Tichit M, Bouchier C, Lafaye P, Rougeon F. Tetrameric and homodimeric camelid IgGs originate from the same IgH locus. *Journal of immunology* (Baltimore, Md. : 1950) [Internet]. 2008 [accessed 2022 Sep 18];181(3):2001–2009. Disponible desde: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/18641337/>. doi:10.4049/JIMMUNOL.181.3.2001

(55) David MPC, Asprer JJT, Ibana JSA, Concepcion GP, Padlan EA. A study of the structural correlates of affinity maturation: antibody affinity as a function of chemical interactions, structural plasticity and stability. *Molecular immunology* [Internet]. 2007 [accessed 2022 Sep 18];44(6):1342–1351. Disponible desde: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/16854467/>. doi:10.1016/J.MOLIMM.2006.05.006

(56) Muyldermans S. Single domain camel antibodies: current status. *Journal of biotechnology* [Internet]. 2001 [accessed 2022 Sep 18];74(4):277–302. Disponible desde: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/11526908/>. doi:10.1016/S1389-0352(01)00021-6

(57) Vu KB, Ghahroudi MA, Wyns L, Muyldermans S. Comparison of llama VH sequences from conventional and heavy chain antibodies. *Molecular Immunology* [Internet]. 1997 [accessed 2022 Sep 18];34(16–17):1121–1131. Disponible desde: doi:10.1016/S0161-5890(97)00146-6

(58) Tillib S v. “Camel nanoantibody” is an efficient tool for research, diagnostics and therapy. *Molecular Biology* 2011 45:1. 2011 [accessed 2022 Sep 18];45(1):66–73. Disponible desde: <https://link.springer.com/article/10.1134/S0026893311010134>. doi:10.1134/S0026893311010134

(59) Revets H, de Baetselier P, Muyldermans S. Nanobodies as novel agents for cancer therapy. *Expert opinion 16-24 hrs biological therapy* [Internet]. 2005 [accessed 2022 Sep 18];5(1):111–124. Disponible desde: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/15709914/>. doi:10.1517/14712598.5.1.111

(60) Muyldermans S, Cambillau C, Wyns L. Recognition of antigens by single-domain antibody fragments: the superfluous luxury of paired domains. *Trends in biochemical sciences* [Internet]. 2001 [accessed 2022 Sep 18];26(4):230–235. Disponible desde: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/11295555/>. doi:10.1016/S0968-0004(01)01790-X

(61) Desmyter A, Transue TR, Ghahroudi MA, Thi MHD, Poortmans F, Hamers R, Muyldermans S, Wyns L. Crystal structure of a camel single-domain VH antibody fragment in complex with lysozyme. *Nature Structural Biology* [Internet]. 1996 [accessed 2022 Sep 18];3(9):803–811. Disponible desde: <https://www.nature.com/articles/nsb0996-803>. doi:10.1038/nsb0996-803

- (62) Harmsen MM, de Haard HJ. Properties, production, and applications of camelid single-domain antibody fragments. *Applied Microbiology and Biotechnology* [Internet]. 2007 [accessed 2022 Sep 18];77(1):13. Disponible desde: [/pmc/articles/PMC2039825/](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/16450109/). doi:10.1007/S00253-007-1142-2
- (63) van der Linden RHJ, Frenken LGJ, de Geus B, Harmsen MM, Ruuls RC, Stok W, de Ron L, Wilson S, Davis P, Verrips CT. Comparison of physical chemical properties of llama VHH antibody fragments and mouse monoclonal antibodies. *Biochimica et biophysica acta* [Internet]. 1999 [accessed 2022 Sep 18];1431(1):37–46. Disponible desde: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/10209277/>. doi:10.1016/S0167-4838(99)00030-8
- (64) Harmsen MM, van Solt CB, van Zijderveld-Van Bemmelen AM, Niewold TA, van Zijderveld FG. Selection and optimization of proteolytically stable llama single-domain antibody fragments for oral immunotherapy. *Applied microbiology and biotechnology* [Internet]. 2006 [accessed 2022 Sep 18];72(3):544–551. Disponible desde: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/16450109/>. doi:10.1007/S00253-005-0300-7
- (65) Vanlandschoot P, Stortelers C, Beirnaert E, Ibañez LI, Schepens B, Depla E, Saelens X. Nanobodies®: new ammunition to battle viruses. *Antiviral research* [Internet]. 2011 [accessed 2022 Sep 18];92(3):389–407. Disponible desde: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/21939690/>. doi:10.1016/J.ANTIVIRAL.2011.09.002
- (66) Kolkman JA, Law DA. Nanobodies – from llamas to therapeutic proteins. *Drug Discovery Today: Technologies* [Internet]. 2010 [accessed 2022 Sep 18];7(2):e139–e146. Disponible desde:
- (67) Liu Y, Huang H. Expression of single-domain antibody in different systems. *Applied microbiology and biotechnology* [Internet]. 2018 [accessed 2022 Sep 18];102(2):539–551. Disponible desde: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/29177623/>. doi:10.1007/S00253-017-8644-3
- (68) Sergeeva A, Kolonin MG, Molldrem JJ, Pasqualini R, Arap W. Display technologies: Application for the discovery of drug and gene delivery agents. *Advanced Drug Delivery Reviews* [Internet]. 2006 [accessed 2022 Sep 18];58(15):1622. Disponible desde: [/pmc/articles/PMC1847402/](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/16450109/). doi:10.1016/J.ADDR.2006.09.018
- (69) ML Haq I, Chaudhry WN, Akhtar MN, Andleeb S, Qadri I. Bacteriophages and their implications 16-24 hrs future biotechnology: A review. *Virology Journal* [Internet]. 2012 [accessed 2022 Sep 18];9(1):1–8. Disponible desde: <https://virologyj.biomedcentral.com/articles/10.1186/1743-422X-9-9>. doi:10.1186/1743-422X-9-9/FIGURES/2

- (70) Marvin D. Filamentous phage structure, infection and assembly. *Current opinion in structural biology* [Internet]. 1998 [accessed 2022 Sep 18];8(2):150–158. Disponible desde: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/9631287/>. doi:10.1016/S0959-440X(98)80032-8
- (71) Rakonjac J. Filamentous Bacteriophages: Biology and Applications. eLS [Internet]. 2012 Jul 16 [accessed 2022 Sep 18]. Disponible desde: doi:10.1002/9780470015902.A0000777
- (72) Barbas III CF, Burton DR, Scott JK, Silverman GJ. Phage Display: A Laboratory Manual. Webster R, editor. Cold Spring Harbor Laboratory Press; 2001.
- (73) Olivera A, Chisea C. Nanoanticuerpos como biopesticidas con actividad antifúngica para su aplicación en agricultura. Montevideo: Universidad ORT Uruguay; 2021.
- (74) Bernasconi F, Lorente S, Ripoll M. Implementación de una plataforma de phage display para la generación de anticuerpos monodominio de llama. Montevideo: Universidad ORT Uruguay; 2019.
- (75) Schlegel S, Löfblom J, Lee C, et al. Optimizing membrane protein overexpression in the *Escherichia coli* strain Lemo21(DE3). *J Mol Biol* [Internet]. 2012;423(4):648-659. Disponible desde: doi:10.1016/j.jmb.2012.07.019

8. Anexo

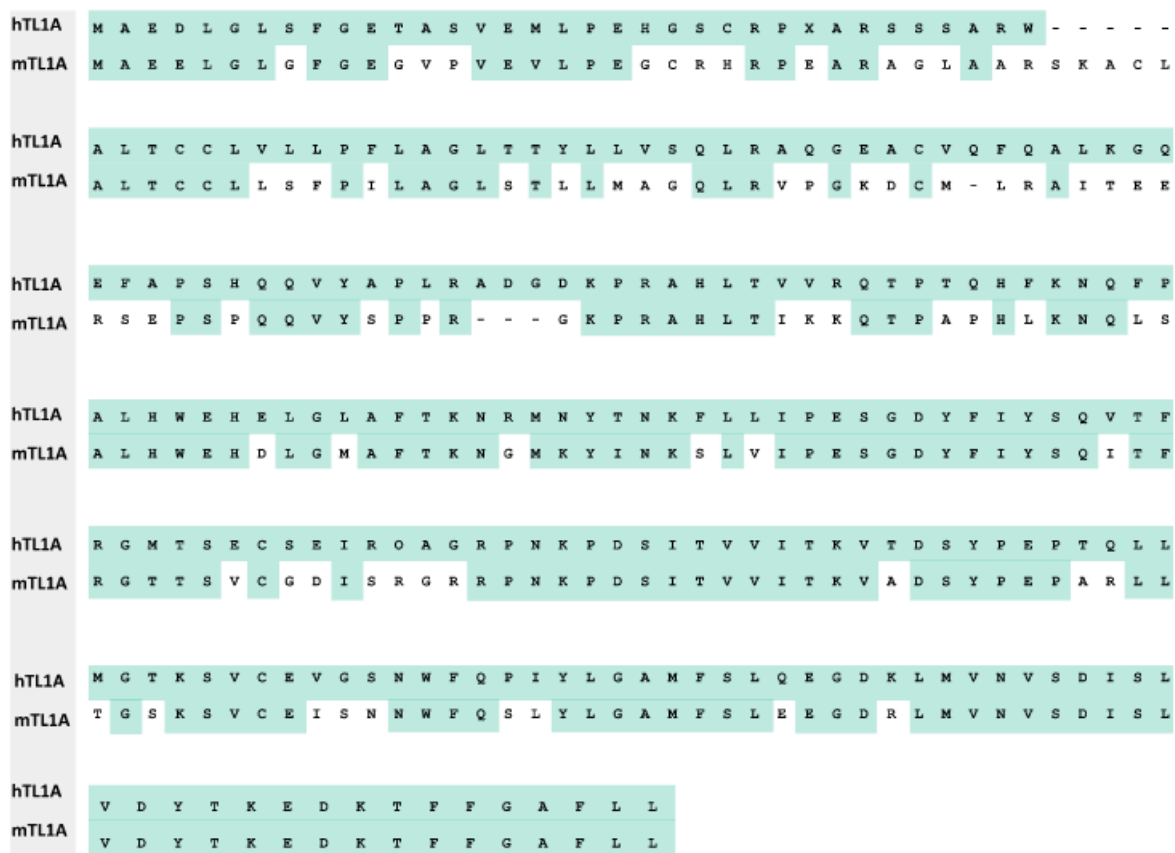


Fig. 1. Anexo. Comparación de secuencias aminoacídicas de TL1A en su versión humana y murina. Aminoácidos idénticos se marcaron del mismo color turquesa, guiones indican brechas entre regiones de homología.

Tabla. 1. Anexo Secuencias identificadoras de las familias de VHH de los ocho nanoanticuerpos α -hTL1A.

VHH	Secuencia
1	MAQVQLVQS
2	MAEVQLVES
3	MAQVQLQES

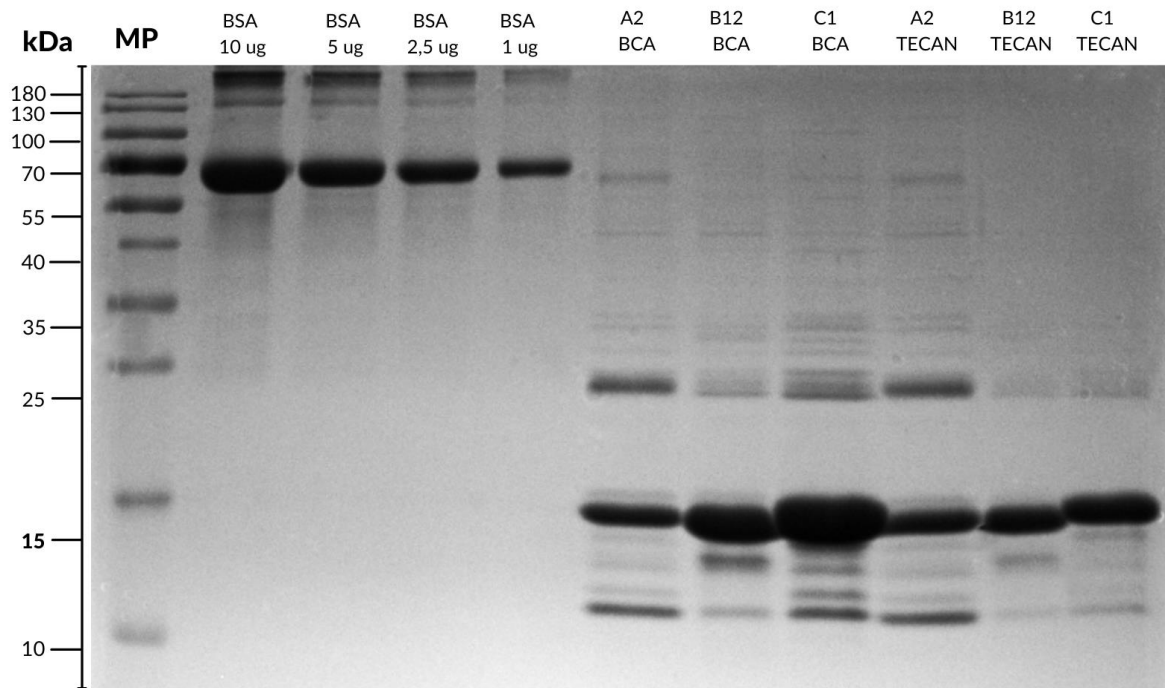


Fig. 2. Anexo. Gel comparativo entre cuantificación proteica estimada del nanoanticuerpo A2, B12 y C1 del grupo 1 (G1) por método de BCA y UV 280 nm (Tecan). Validado por medio de una electroforesis SDS-PAGE 15% utilizando como curva patrón concentraciones decrecientes de BSA (Carriles 2-5). Se sembraron las concentraciones estimadas por BCA (carriles 6-8) y por UV 280 nm (carriles 9-11). Se observa que el método más certero fue el de UV, siendo subestimadas las concentraciones por BCA.

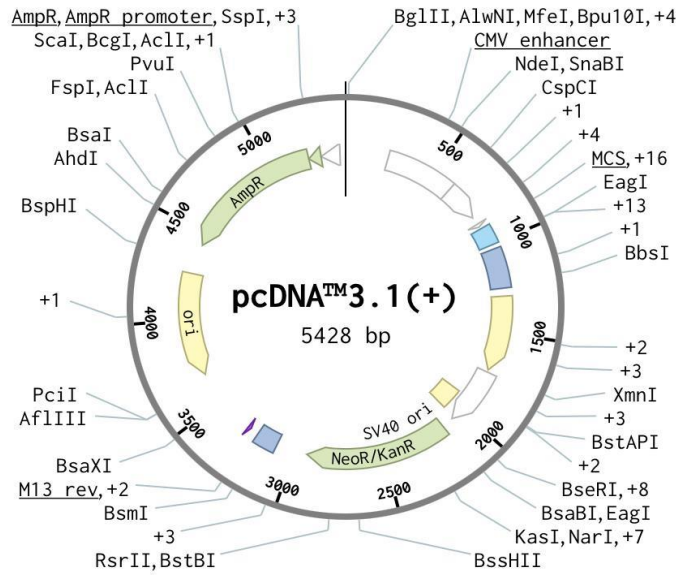


Fig. 3. Anexo. Diagrama esquemático del plásmido pcDNA3.1 utilizado en la transfección de células HEK-293 por lipofectamina.

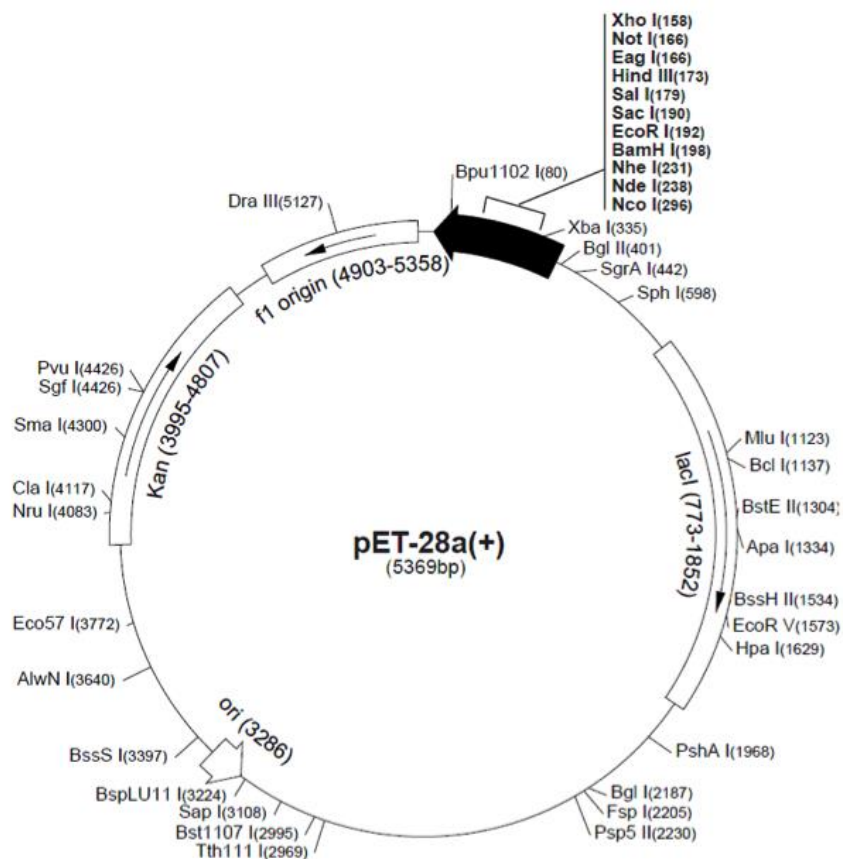


Fig. 4. Anexo. Diagrama esquemático del plásmido pET-28a utilizado en el subclonaje de secuencias desde el plásmido pComb3X.